

This page Is Inserted by IFW Operations
And is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-127861

(43)公開日 平成11年(1999) 5月18日

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	FI	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 7/06		C 0 7 K 7/06	
		7/08	
		16/38	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 9/99	
審査請求 未請求 請求項の数 3 OL (全 32 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平9-297451	(71)出願人	000231109 株式会社ジャパンエナジー 東京都港区虎ノ門二丁目10番1号
(22)出願日	平成9年(1997)10月29日	(72)発明者	三沢 悟 埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式会社ジャパンエナジー内
		(72)発明者	大場 洋一 埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式会社ジャパンエナジー内
		(72)発明者	上野 貴将 埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式会社ジャパンエナジー内
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチド

(57)【要約】

【課題】 C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチドの提供。

【解決手段】 下記アミノ酸配列

(I) : Asp-Xaa-Val-Leu-Ile、又は

(II) : Xaa-Tyr-Val-Leu-Ile

(Xaaは、Asp、Ala、Glu又はArgを表す)、あるいは、
下記アミノ酸配列 (III) : Asn-Ser-Asn-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Thr-Ser-Tyr-Asn-Leu-Lys-Phe-Lys-Gly

を含み、全鎖長が17~20アミノ酸の直鎖状ペプチドからなる、C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記アミノ酸配列（I）：

Asp-Xaa-Val-Leu-Ile

（Xaaは、Tyr、Trp又はPheを表す）を含み、全鎖長が7～20アミノ酸の直鎖状ペプチドからなる、C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチド。

【請求項2】 下記アミノ酸配列（II）：

Xaa-Tyr-Val-Leu-Ile

（Xaaは、Asp、Ala、Glu又はArgを表す）を含み、7～20アミノ酸の直鎖状ペプチドからなる、C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチド。

【請求項3】 下記アミノ酸配列（III）：

Asn-Ser-Asn-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Thr-Ser-Tyr-Asn-Leu-Lys-Phe-Lys-Gly

を含み、7～20アミノ酸の直鎖状ペプチドからなる、C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）由来のセリンプロテアーゼに対して、その酵素活性を阻害する中和抗体部分ペプチドに関し、具体的には、該HCVセリンプロテアーゼに対する抗体蛋白質中の相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）と同一又は類似するアミノ酸配列を有する人為的なペプチドに関する。特に、哺乳動物に免疫した際に産生される抗HCVセリンプロテアーゼIgG抗体蛋白質と同様、本発明のペプチドは、当該HCVセリンプロテアーゼと結合し、その酵素活性を阻害する作用を持つ20アミノ酸以下の直鎖状ペプチドに関するものである。なお、本発明のペプチドは、その中和抗体との機能的類似性から中和抗体部分ペプチドと称する。

【0002】

【従来の技術】C型肝炎は、C型肝炎ウイルス（hepatitis C virus; HCV）の感染により引き起こされ、その感染経路は、血液を介した非経口感染であることが知られている。このHCVは、（+）鎖のRNAをゲノムとして有するRNAウイルスであり、宿主細胞中において、図1に示すように、このゲノム上の翻訳領域から、3,010アミノ酸からなる一本鎖のポリプロテインが翻訳される。この一本鎖ポリプロテインは、宿主細胞由来のシグナルペプチダーゼ、及び前記のゲノム上にコードされている、HCV由来のセリンプロテアーゼにより切断されて、それぞれの機能蛋白質となる。

【0003】上記シグナルペプチダーゼ及びセリンプロテアーゼにより切断される箇所は合計7箇所存在する。このうち、宿主細胞由来のシグナルペプチダーゼは計4箇所の切断を行い、HCV由来のセリンプロテアーゼは残

る3箇所の切断を行う。この過程が、新たなHCVウイルス粒子の生成における初期過程である。従って、HCV由来のセリンプロテアーゼの酵素活性が阻害されると、宿主細胞内での新たなHCVウイルス粒子の生成が果たせられず、HCVに感染した患者の肝臓組織における感染の拡がりを抑えることができる。この観点から、HCV由来のセリンプロテアーゼに対する酵素活性阻害剤の探索・開発の研究が進められている。なお、HCVは二種類のプロテアーゼを産生しており、その一種であるHCV由来のセリンプロテアーゼはCpro-2という略称が付されている。Cpro-2は、ゲノム上においてNS3と呼ばれる領域にコードされるため、NS3蛋白質と呼ばれることもある。更には、このNS3蛋白質は、631アミノ酸からなるもので、その分子量からp70と呼ぶことも多い。

【0004】これらの酵素活性阻害剤の開発に際しては、阻害能を評価することが不可欠であり、試験管内の酵素アッセイ系が利用されている。HCV由来のセリンプロテアーゼに関しても、酵素アッセイ系に利用できる組換え型のHCVセリンプロテアーゼ並びにその基質となる合成ペプチド又は組換え基質蛋白質が提案されている。加えて、相当に高い阻害能を有する基準となる阻害物質がこの種の評価の再現性を維持するために必要であり、既に、基準となる阻害物質になり得る、幾つかの化合物が報告されている。その一つとして、HCVセリンプロテアーゼに対する抗体であって、且つHCVセリンプロテアーゼと結合した際、その酵素活性を阻害する中和抗体と称されるものが挙げられる。

【0005】本発明者らは、HCV由来セリンプロテアーゼに特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を創製し、更には、該抗体はHCV由来セリンプロテアーゼと結合することで、その酵素活性を強く阻害することを見出した（特開平9-206076号公報を参照）。即ち、HCVセリンプロテアーゼCpro-2に対する中和抗体として、以下に示す三種のマウスハイブリドーマ細胞株の産生するマウスモノクローナルIgG抗体を既に提案している。具体的には、ハイブリドーマ細胞株であるJE-7E3（FERM BP-5279）、JE-7E9（FERM BP-5280）、JE-8D4（FERM BP-5281）が産生するマウスモノクローナルIgG抗体であり、前記三種のハイブリドーマ細胞株は、何れも工業技術院生命工学工業技術研究所（生命研）に、前記の識別のための表示と寄託機関の付与した寄託番号の基に寄託されている。以降、前記のハイブリドーマ細胞株、JE-7E3（FERM BP-5279）、JE-7E9（FERM BP-5280）、JE-8D4（FERM BP-5281）が産生するCpro-2に対するIgG抗体を、それぞれmAb 7E3、mAb 7E9、mAb 8D4と称する。

【0006】これらの中和抗体を多量に入手するには、ハイブリドーマ細胞株の培養液から分離精製する手法が挙げられるが、一般に抗体蛋白質自体は、室温での長期保存には適さないもので、そのほかに、これらの中和抗体

と阻害の機能においては等価であり、基準となる阻害物質として利用できる低分子量の化合物を得る手法も必要である。特に、簡便な合成により純品を得ることができ、且つ保存の容易な低分子量の阻害物質の提案が望まれるものである。さらには、これら抗体の低分子化による抗HCV薬のリード化合物としての開発が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、阻害の機能においてはCpro-2に対するIgG抗体（中和抗体）と等価であり、且つ簡便な合成により純品を得ることができ、且つ保存の容易な低分子量の阻害物質を提供することを目的とする。具体的には、本発明は、HCVセリンプロテアーゼと結合し、その酵素活性を阻害する作用を持つ、化学的なペプチド合成により作製が可能な程度の鎖長である直鎖状ペプチド、即ち、その中和抗体との機能的類似性から中和抗体部分ペプチドと称する低分子量の阻害物質を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、mAb 8D4抗体の相補性決定領域にあたる計6部位のアミノ酸配列を同定し、そのアミノ酸配列を模倣した直鎖状ペプチドを作製し、該ペプチドの特定のものが、Cpro-2に対する酵素活性阻害能を有するものであることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明は、下記アミノ酸配列

(I) :

Asp-Xaa-Val-Leu-Ile (配列番号1)

(Xaaは、Tyr、Trp又はPheを表す)を含み、全鎖長が7~20アミノ酸の直鎖状ペプチド、又は下記アミノ酸配列(II) :

Xaa-Tyr-Val-Leu-Ile (配列番号2)

(Xaaは、Asp、Ala、Glu又はArgを表す)を含み、全鎖長が7~20アミノ酸の直鎖状ペプチド、あるいは下記アミノ酸配列(III) :

Asn-Ser-Asn-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Thr-Ser-Tyr-Asn-Leu-Lys-Phe-Lys-Gly (配列番号3)

を含み、全鎖長が7~20アミノ酸の直鎖状ペプチドからなる、C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチドである。

【0010】ここで、前記のアミノ酸配列(I)及びアミノ酸配列(II)は、mAb 8D4抗体のL鎖及びH鎖の可変領域に、それぞれ3箇所(合計6箇所)存在する相補性決定領域(CDR1~3)中、H鎖のCDRの一つであるCDR-1と称される部分のアミノ酸配列(IV) :

Asp-Tyr-Val-Leu-Ile (配列番号4)を基にして設計され合成されたものであり、その第一及び第二のアミノ酸を別のアミノ酸に置き換えたものに相当する。また、アミノ酸配列(III)は、mAb 8D4抗体のH鎖の相補

性決定領域(CDR)中、CDR-1以外のCDR、すなわち残り二つのCDRのうちの一つであるCDR-2と称される部分に相当する。以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明者はまず、上記の三種のハイブリドーマ細胞株が産生するマウスモノクローナルIgG抗体のエピトープ部位の特定を試みた。これら三種のIgG抗体mAb 7E3、mAb 7E9、mAb 8D4は、何れも、HCVのNS3蛋白質、即ちp70と称されるタンパク質のアミノ酸残基の領域中に存在する一部のアミノ酸配列である。特に、上記抗体は、p70のアミノ酸配列のN末側半分の領域に存在するプロテアーゼ活性領域、具体的にはCpro-2と称される領域(HCVゲノム上にコードされる一連のアミノ酸配列のうち、第1027番目のアラニンから第1185番目のプロリンまでの190個のアミノ酸残基)中に存在するエピトープとなるアミノ酸配列を有する抗体であることが確認された。

【0012】なお、p70は、HCVゲノム上にコードされる3010個のアミノ酸からなる一連のアミノ酸配列のうち、第1027番目のアラニンから第1657番目のスレオニンまでの631個のアミノ酸残基からなるタンパク質であり、該アミノ酸配列とそれをコードする塩基配列を参考のため、配列番号5に記載する。

【0013】ここで、HCVゲノム上にコードされるアミノ酸配列中の第1027番目のアミノ酸であるアラニンはp70のアミノ酸配列を基準にすれば第1番目のアミノ酸であるので、このアミノ酸は「Ala¹」のようにアミノ酸の右上にp70におけるアミノ酸の位置を表示して記載することができる。この方法に基づいて当該Cpro-2のアミノ酸配列を記述するとき、mAb 7E3はGly⁸⁴-Trp⁸⁵-Pro⁸⁶を、mAb 7E9はArg¹¹⁷-Arg¹¹⁸-Arg¹¹⁹-Gly¹²⁰を、mAb 8D4はAsp⁷⁹-Gln⁸⁰-Asp⁸¹-Leu⁸²-Val⁸³を、それぞれエピトープとしていることが判明した。

【0014】本発明者らが先に解明した通り(特開平9-9961号公報を参照)、当該HCV由来のセリンプロテアーゼ; Cpro-2の酵素活性発現に不可欠な部分アミノ酸配列は、Val³⁵~Val¹⁷²の部分であり、特に、キモトリプシン様セリンプロテアーゼに特徴的な配列; His⁵⁷~Gly¹⁵²、(H-X₂₂-VXXD-X₅₅-GXSGXP-X₉-G)中に、これらエピトープとなる三種のアミノ酸配列が存在している。なお、このセリンプロテアーゼの触媒活性部位を構成する主要なアミノ酸(His⁵⁷、Asp⁸¹、Ser¹³⁹)の一つであるAsp⁸¹を含む、エピトープ配列Asp⁷⁹-Gln⁸⁰-Asp⁸¹-Leu⁸²-Val⁸³(配列番号6)に結合するmAb 8D4抗体は、触媒活性部位を直接被覆するため酵素活性を阻害している。また、前記のAsp⁸¹に近接するエピトープ配列Gly⁸⁴-Trp⁸⁵-Pro⁸⁶に結合するmAb 7E9抗体は、触媒活性部位に基質が挿入される過程において、立体障害となるので酵素活性を阻害すると考えられる。加えて、Cpro-2に対する結合活性の点でも、mAb 8D4抗体は、mAb 7

E9抗体及びmAb 7E3抗体と比較し有意に結合活性に優れることを見出した。

【0015】これらの知見に基づき、mAb 8D4抗体の相補性決定領域と同一又は類似するアミノ酸配列を有する直鎖状ペプチドにおいても、Cpro-2に対する結合活性が保持され、且つCpro-2の触媒活性部位又はその近傍に結合することで酵素活性を阻害するとの着想を得た。

【0016】1. 本発明のC型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体ペプチドについて、更に詳しく説明する。

(1) 第一に、本発明の中和抗体ペプチドは、上記アミノ酸配列(I) (配列番号1) 又はアミノ酸配列(II)

(配列番号2) を含み、全鎖長が7~20アミノ酸からなる直鎖状ペプチドである。

【0017】このアミノ酸配列(I) 又はアミノ酸配列(II) は、HCVセリンプロテアーゼと選択的に結合するmAb 8D4抗体のH鎖の可変領域に存在する3箇所の相補性決定領域(CDR) の一つであるCDR-1 のアミノ酸配列

(アミノ酸配列(IV)) と同一のもの又はその一部のアミノ酸を改変したものである。従って、この中和抗体ペプチドは、mAb 8D4抗体のH鎖により結合されるHCVセリンプロテアーゼ上の特定の部位及びエピトープ部位を共通にしている。

【0018】後述の実施例において示すとおり、本発明のペプチドは、基本となるmAb 8D4抗体と同様にHCVセリ

8D4 VH FOR

5' - NNNGCGCCGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC - 3' (配列番号68)

Eag I

8D4 VH BACK

5' - NNNGGCCGAGCCGCCATGGCCGAGATTGAGCTGCAGCAGAC - 3' (配列番号69)

Sfi I

(L鎖遺伝子クローニング用)

8D4 VL FOR

5' - NNNGCGCGTTATTTCAGCTTGGTCCCC - 3' (配列番号70)

Sac II

8D4 VL BACK

5' - NNNGATATCGTGATGAGCCAGGCTGCA - 3' (配列番号71)

EcoRV

(NはA, G, C又はT)

【0021】得られたH鎖遺伝子を制限酵素Sfi IとEag Iで切断し、L鎖遺伝子を制限酵素EcoRVとSac IIで切断した後、アミノ酸配列[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]で3回繰り返したペプチドリンカーをコードする合成DNAを介して連結し、mAb 8D4一本鎖Fv遺伝子を構築する。

【0022】② mAb 8D4一本鎖Fv発現ベクターの構築
市販のファージT7プロモーターを有する発現ベクターpET-20b (+) (Novagen社) を制限酵素Xba Iで切断した後、Klenow処理により平滑末端化する。さらに、制限酵素EcoRIで切断し、ベクター断片を調製する。上記、mAb 8D4一本鎖Fv遺伝子の上流に、ペクテートリアーゼ

ンプロテアーゼ活性中心又はその近傍への優れた結合能を有するとともに、それに付随してHCVセリンプロテアーゼの酵素活性を阻害する効果も秀でている。

【0019】なお、mAb 8D4抗体の可変領域であるFv領域をコードするcDNAの塩基配列及びその対応するアミノ酸配列を、H鎖に関して図2及び配列番号7に、L鎖に関して図3及び配列番号8にそれぞれ示す。また、本発明者は、このmAb 8D4抗体FvのH鎖をコードするcDNA及びL鎖をコードするcDNAを一本鎖抗体(single chain Fv)の形で発現させるために、上記各cDNAをともに同一のプラスミドに組み込み、それを大腸菌に導入して形質転換大腸菌株E. coli JM109/pET-8D4を作製した。なお、形質転換大腸菌株E. coli JM109/pET-8D4 (FERM P-1644) は、工業技術院生命工学工業技術研究所(生命研)に、前記の識別のための表示と寄託機関の付与した寄託番号の基に寄託されている。mAb 8D4一本鎖Fv発現ベクターpET-8D4は以下のようにして構築することができる(図22参照)。

【0020】① mAb 8D4一本鎖Fv遺伝子の構築
RT-PCRによりクローニングしたmAb 8D4 Fv遺伝子を有するプラスミドpT7VH-C (H鎖遺伝子) およびpT7VL-C (L鎖遺伝子) を鋳型として、以下に示すDNAプライマーを用いてPCRによりH鎖およびL鎖遺伝子を増幅する。(H鎖遺伝子クローニング用)

(pelB) のシグナル配列遺伝子を連結する。一方、下流には、c-mycタグおよび6残基のHisタグをコードするDNA断片を連結する。この融合遺伝子断片とpET-20b (+) ベクターとを連結し、pET-20b (+) に融合遺伝子断片を導入することにより、図22に示す発現ベクターpET-8D4を構築することができる。

【0023】上記本発明のペプチドは、mAb 8D4抗体のH鎖のCDR-1に相当する5アミノ酸からなるアミノ酸配列(I) 又はアミノ酸配列(II) の両端に複数のアミノ酸配列を付加し、全鎖長が7~20アミノ酸の直鎖状ペプチドとなっている。本発明では、この両端に付加される

1個又は複数のアミノ酸配列は、その基本となるアミノ酸配列を有するmAb 8D4抗体において、アミノ酸配列 (I V) のN末端側及びC末端側に連結されているアミノ酸配列をそのまま利用するのが好ましい。即ち、アミノ酸配列 (IV) を含む連続した7〜20アミノ酸の断片を基に、そのアミノ酸配列 (IV) の一部のアミノ酸を別のアミノ酸に置き換えてアミノ酸配列 (I) 又はアミノ酸配列 (II) にするのが好ましい。

【0024】あるいは、mAb 8D4抗体はマウスのIgG1抗体であるので、他のIgG1抗体、例えば、mAb 7E3抗体、mAb 7E9抗体のH鎖のCDR-1 近傍のアミノ酸配列を用いて、そのCDR-1 の5アミノ酸をアミノ酸配列 (I) 又はアミノ酸配列 (II) に置き換えたものとしてもよい。即ち、H鎖のCDR-1 に相当する5アミノ酸部分の両端に連結される1個又は複数のアミノ酸は、それ自体で抗原ペプチド部位との結合自体には直接関与はしておらず、結合に関与するCDR-1 に相当する5アミノ酸部分を適切な形状に保持する役割を持つ部分であるので、同じ構造を有するマウスのIgG1抗体の対応する断片を利用しても、形状自体はほぼ同じものとなる。これは、抗体自体に固有な相補性決定領域の違いを除くと、分子の形状は、本質的に同種サブクラスに属する抗体相互では極めて類似したものとなることを利用するものである。

【0025】(2) 第二に、本発明の中和抗体ペプチドは、上述のアミノ酸配列 (III) を含み、全鎖長が17〜20アミノ酸の直鎖状ペプチドである。アミノ酸配列 (II I) (配列番号3) は、mAb 8D4抗体のH鎖の可変領域に存在する3箇所の相補性決定領域 (CDR) の一つであるCDR-2 のアミノ酸配列である。従って、この中和抗体ペプチドも、mAb 8D4抗体のH鎖により結合されるHCVセリンプロテアーゼ上の特定の部位であるエピトープ部位を共有しており、本発明のペプチドを設計するための基本としたmAb 8D4抗体と同様にHCV抗原への高い結合能を有するとともに、それに付随してHCVセリンプロテアーゼの酵素活性を阻害する作用をもつ。

【0026】本発明の上記第二のペプチドは、上述のアミノ酸配列 (III) 自体がmAb 8D4抗体のH鎖のCDR-2 そのものである。そして、(1)に記載のペプチドとは異なり、それ自体が17アミノ酸からなっているので、その中の一部の配列が抗原ペプチド部位との結合に直接関与するとともに、残りの配列が結合能を保つに適切な形状に保持する役割をも果たしている。従って、更に1個又は複数のアミノ酸を付加しても結合能には何らの影響を与えることはないので、アミノ酸を付加したとしてもその数は3個 (全長20アミノ酸) までで十分である。従って、付加された1〜3個のアミノ酸は、基本となるmAb 8D4抗体のアミノ酸配列中、CDR-2 のアミノ酸配列の上流又は下流に連結されたものから選択する必要はない。なお、同じ構造を有するマウスのIgG1抗体の対応するH鎖のCDR-2 断片の上流又は下流に見出されるアミノ酸を

付加される1〜3個のアミノ酸として利用してもよい。

【0027】2. ペプチドの合成

上述した(1)及び(2)に記載のペプチド鎖を20アミノ酸以下とするのは、この程度のアミノ酸数であれば、化学的な合成法を適用して容易に作製が可能であるからである。通常、上述した方法に従い付加されるアミノ酸の配列を適宜決定したのち、汎用のペプチド合成法 (例えば固相合成法) により、目的とするペプチドを調製することができる。従って、得られるペプチドは、不要な不純物の極めて少ないものとなる。なお、不純物としては、ペプチド鎖長が1つ短い、合成の前段階の中間原料ペプチドが挙げられるが、多くの場合この中間原料ペプチド自体も阻害活性は遜色のないものであり、これを含んだ状態で標準阻害物質として使用することが可能である。

【0028】なお、1. (1)に記載のペプチドにおいては、H鎖のCDR-1 に相当する5アミノ酸部分の両端に連結される複数のアミノ酸は、少なくとも1アミノ酸以上が何れの端にも付加され、それぞれほぼ同数に選択することが望ましい。一般に、それぞれ3〜7アミノ酸、特に5〜7アミノ酸を選択し、全長として11〜19アミノ酸、特に15〜19アミノ酸とするのが好ましい。一方、1. (2)に記載のペプチドの場合は、付加されるアミノ酸は、何れか一方の端のみであっても構わない。

【0029】本発明の中和抗体部分ペプチドは、in vitroのHCVセリンプロテアーゼ酵素アッセイ系における標準阻害物質として利用されるものである。主として、HCVセリンプロテアーゼとして、組換え型酵素を利用する酵素アッセイ系における標準阻害物質として利用されるものである。すなわち、本発明のペプチドは、これらの酵素反応系におけるデータの正確性、再現性を検証する目的で使用される。その点で、本発明のペプチドは取り扱いが抗体と比べて格段に容易であり、また、阻害機構は、酵素蛋白質と分子間結合を形成するものであるもので、極めて再現性の高い阻害となる。但し、保管するに際して特段の注意を要しないが、水分の付着による見かけの重量増加が生じないように注意する必要がある。その他は、一般の試薬類と同じく、長期保存に耐え、また、分子量が既知であるので、濃度調製が容易な標準阻害物質となる。

【0030】

【実施例】以下、実施例により、本発明の中和抗体部分ペプチド及びその反応性についてさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。先ず、本発明の中和抗体部分ペプチドを設計するための基本とされたmAb 8D4抗体の特異性に関して説明し、それにより、本発明の中和抗体部分ペプチドは、HCVセリンプロテアーゼと結合して、その酵素活性を阻害するものであることを説明する。

【0031】(参考例1) 既に、マウスハイブリドーマ細胞株、JE-7E3 (FERM BP-5279)、JE-7E9 (FERM BP

—5280)、JE-8D4 (FERM BP-5281) が産生するCpro-2 に対するIgG抗体 (それぞれ、mAb 7E3、mAb 7E9、mAb 8 D4と称する) は、免疫抗原としてHCVセリンプロテアーゼCpro-2を用いて調製されたものである。そして、上記抗体は、このHCVセリンプロテアーゼCpro-2と結合し、その酵素活性を阻害する抗体であることが確認されている (特開平9-206076号公報を参照)。この三種のmAbの結合活性を定量的に評価するために、表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサーIAsys Auto+ (日製産業) を用いてHCVプロテアーゼと各mAbとの相互作用の解析を行った。

【0032】カルボキシメチルデキストランがコートされたキュベットに、N-ヒドロキシスクシンイミド (N-Hydroxysuccinimide) と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) を用いて、大腸菌マルトース結合

蛋白質 (MBP) とHCVプロテアーゼが融合した酵素蛋白質 MBP-NS3₁₋₆₃₁ をカップリングした。キュベット上にMBP-NS3₁₋₆₃₁ (30 µg/ml) 50 µlを固相化した結果、2800 arc secondsの結合が確認された。このキュベットに種々の濃度 (33.3 nM~666.7 nM) のmAbを添加し、結合活性を調べた。

【0033】図4~図6にmAb添加濃度に対する結合活性の指標kon値をプロットしたLinearFitの結果を示す。図4はmAb 8D4の結合能を、図5はmAb 7E9の結合能を、図6はmAb 7E3の結合能を調べたものである。また、表1に三種のmAbのHCVプロテアーゼに対する結合のKineticsの結果を示す。本結果より、mAb 8D4>mAb 7E3>mAb 7E9の順で結合活性が強いことが判明した。

【0034】

【表1】

抗体の名称	Hmax	解離定数 Kd
mAb 8D4	101.3±10.7	3.28 ± 1.28×10 ⁻⁸
mAb 7E3	71.3± 5.8	7.88 ± 2.31×10 ⁻⁸
mAb 7E9	68.9± 9.6	15.0 ± 5.9 ×10 ⁻⁸

【0035】Bmaxは、抗体蛋白質との結合比率の指標を意味する。

(参考例2) ウサギ網状赤血球溶血液を用いたin vitro翻訳系によるmAbのHCVプロテアーゼに対する阻害活性評価

表1記載の三種のmAbは、組換え型HCVプロテアーゼMBP-NS3₁₋₆₃₁ に対してその酵素阻害活性を有することは、既に報告されている (特開平9-206076号公報を参照)。また、合成ペプチドを基質として再評価した結果、図7に示すように三種のmAbともほぼ同等の阻害活性を示し、mAb 8D4において、最大80%の阻害が達成されている。

【0036】HCVポリプロテインのプロセッシングに対する上記のmAbの影響を調べるために、まず、ウサギ網状

赤血球溶血液を用いたHCVゲノムの試験管内転写・翻訳系を構築した (図8)。つまり、HCV NS3遺伝子又はHCV NS3/4A遺伝子をバクテリオファージT7プロモーターの下流に連結し、T7 RNAポリメラーゼの作用でmRNAに転写させ、[³⁵S]メチオニンを放射ラベルとして、NS3蛋白質又はNS3/4A蛋白質を翻訳させた。一方、HCVプロテアーゼの天然基質としてHCV NS5A/5B切断配列を含む遺伝子を同様に翻訳させた。これらの翻訳産物を用いて、HCVプロテアーゼのcisおよびtransの切断活性評価系を構築し、HCVプロテアーゼ活性に対するmAbの影響について調べた。以下に示す組成で、NS3プロテアーゼ又はNS3/4Aプロテアーゼのin vitro翻訳反応を行った。

【0037】

【表2】

TNT網状赤血球溶解物	25 µl
TNT反応バッファー	2 µl
TNT T7 RNA ポリメラーゼ	1 µl
アミノ酸混合物 (1 mM), メチオニン不含	1 µl
³⁵ S-メチオニン (1,000 Ci/mmol)	4 µl
RNasin リボヌクレアーゼ阻害剤 (40 U/µl)	1 µl
DNAテンプレート (プラスミド, 100 ng/µl)	10 µl
H ₂ O	6 µl
計	50 µl

【0038】上記混合液を30℃で90分間インキュベートした後、等量の2×SDS-PAGE用サンプルバッファーを添加し、反応を止めた。12%ゲルを用いたSDS-PAGEにより翻訳産物を分離し、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィを行った。NS3遺伝子を有するプラスミドpTZNS3Kを鋳型とした場合、分子量70 kDaの位置に翻訳産物が確認された。一方、NS3/4A遺伝子を有するプラスミドpTZNS3-4Kを鋳型とした場合、分子量77 kDaおよび70 kDaの位置に二本の主要な翻訳産物が確認された。後者はNS3蛋

白質であり、前者はNS3/4A融合蛋白質である。この結果から、pTZNS3-4Kを用いる翻訳系は、いったんNS3/4A融合蛋白質が翻訳された後、分子内 (cis) での切断が起こり、NS3蛋白質とNS4A断片に分解される系であることが確認された。

【0039】NS3/4A遺伝子翻訳産物は経時的にNS3プロテアーゼとNS4A断片に自己触媒的に切断されることが確認されたので、この切断に対する三種のmAb抗体の影響を調べた。プラスミドpTZNS3-4Kを鋳型として、上記T

NT反応液に終濃度100 ng/ μ l (667 nM) となるようにmAb 7E3, mAb 7E9およびmAb 8D4をそれぞれ添加し、転写・翻訳反応を行った。SDS-PAGEの後、乾燥させたゲルをイメージアナライザー (BAS2000TM, 富士フイルム) によりcisの切断により生じる分子量70 kDaの位置にあるNS3プロテアーゼのバンドの放射活性を定量した。なお、これらの実験においては、転写・翻訳反応は、30℃で2時間とした。

【0040】NS3/4A融合蛋白質のcisの切断に対する三種のmAbの影響を調べた結果、図9のSDS-PAGEの結果に示すように終濃度100 ng/ μ lではmAb 8D4のみ顕著な阻害活性を示した。図9中、レーン1は、NS3プロテアーゼの位置、レーン2は、NS3/4A融合蛋白質とcisの切断により生成するNS3プロテアーゼ、レーン3は、mAb 7E3抗体終濃度100ng/ μ l添加時、レーン4は、mAb 7E9抗体終濃度100ng/ μ l添加時、レーン5は、mAb 8D4抗体終濃度100ng/ μ l添加時におけるNS3/4A融合蛋白質のcisの切断に対する影響を示す。

【0041】さらに、mAb 8D4は容量依存的に阻害活性を示し、50%阻害濃度 (IC_{50}) は10 ng/ μ l (66.7 nM) という強い阻害が確認された (図10)。図10のSDS-PAGEの写真中、レーン1は無添加時、レーン2は100 ng/ μ l、レーン3は50 ng/ μ l、レーン4は25 ng/ μ l、レーン5は12.5 ng/ μ l、レーン6は6.25 ng/ μ l、レーン7は3.13 ng/ μ l、レーン8は1.56 ng/ μ lの終濃度でmAb 8D4抗体を添加した際の結果を示し、それをプロットした結果が付されたグラフを電気泳動図の下に示す。

【0042】次に、transでの切断活性を評価する系を同様に構築した。NS3プロテアーゼ及びNS3/4Aプロテアーゼはそれぞれ反応液25 μ l中、Canine Pancreatic Microsomal Membraneを1.8 μ l添加して放射標識せずに翻訳反応を行った。30℃で2時間反応を行った後、終濃度2.5 mMとなるようにCycloheximideを添加し、翻訳反応を停止させた。一方、NS5A/5B切断配列を含む天然基質 (NS5AのC末端100アミノ酸と完全長NS5Bを含む蛋白質) を [³⁵S]メチオニンで放射ラベルした。プラスミドpTZNS5を鋳型としてNS5A/5Bを翻訳させた結果、図11に示すように分子量90 kDaの位置に主要な翻訳産物が確認され、さらに低分子側に分解産物と考えられるバンドがいくつか確認された。

【0043】このNS5A/5B翻訳産物を基質として、これに、放射ラベルせずに合成したNS3プロテアーゼ溶液又はNS3/4Aプロテアーゼ溶液を等量混合し、30℃で2時間切断反応を行った後、SDS-PAGEを行い、切断産物である分子量66 kDaのNS5B蛋白質の放射活性をイメージアナライザーにより定量した。その結果、NS3/4Aプロテアーゼを混合したものでのみNS5A/5B切断配列における切断が確認され、NS3単独の酵素では全く切断されなかった (図11)。

なお、反応温度を37℃で反応させた場合、切断活性は低下した。図11のSDS-PAGE分析の結果にお

いて、プラスミドpTZNS5を鋳型としてNS5A/5Bを翻訳させる際、レーン1は酵素のない条件、レーン2はNS3プロテアーゼ溶液添加、レーン3はNS3/4Aプロテアーゼ溶液添加した際の結果、具体的には切断産物である分子量66 kDaのNS5B蛋白質量を比較する。

【0044】一方、反応系に終濃度1.25~40 mMのDTTを添加したところ、終濃度10 mMの場合に無添加に比べて約1.6倍活性が強かった。そこで、終濃度10 mMとなるようにDTTを添加し、30℃で5時間まで反応の経時変化を調べた結果、2時間まで直線性が見られたため、最終的に2時間の反応を行わせる際に、mAbを添加して影響を調べた。

【0045】最適条件でのtrans切断アッセイにおいて、終濃度100 ng/ μ lとなるようにmAbを添加した結果、図12に示すようにDTTを添加しない場合には、ほとんど阻害活性は確認されなかった。また、DTTを添加した場合には、見かけ上僅かながら阻害されている傾向が観測されたが、測定誤差を考慮すると有意な阻害活性があるとは見なせないと判断した。つまり、三種類のmAbは、NS3プロテアーゼ活性は阻害するものの、酵素活性が増強されたNS4A結合型NS3プロテアーゼに対しては有意な阻害活性を示さないことが判明した。このことは、NS3/4A融合蛋白質のcisの切断で生成するNS4A断片がNS3蛋白質と結合することによりNS3プロテアーゼに構造変化が誘導され、又はこれらの抗体との結合が困難になるためであると考えられた。

【0046】図12のSDS-PAGE分析の結果において、プラスミドpTZNS5を鋳型としてNS5A/5Bを翻訳させる際、レーン1~5はDTT非存在下で、レーン6~10は10 mM DTT存在下で試験したものである。また、レーン1と6はそれぞれNS3/4Aプロテアーゼ溶液添加のない場合と溶液添加のある場合を示し、レーン2と7はリン酸緩衝液を添加したとき、レーン3と8はmAb 7E3抗体終濃度100 ng/ μ lで添加したとき、レーン4と9はmAb 7E9抗体を終濃度100 ng/ μ lで添加したとき、レーン5と10はmAb 8D4抗体を終濃度100 ng/ μ lで添加したときの切断産物である、分子量66 kDaのNS5B蛋白質量をそれぞれ示す。また、電気泳動図の下に示すグラフは、前記の各条件において生成したNS5B蛋白質量を図示したものである。

【0047】今回構築したtransの切断アッセイ系の場合、NS5A/5B切断配列における切断においては、NS4A断片の結合によるNS3プロテアーゼの活性上昇作用が必須であることが判明した。三種類のmAbが有意な阻害を示さなかったのは、NS4A断片の結合がNS3プロテアーゼの立体構造を変化させることにより、または、NS4A断片の結合に伴う立体障害により、mAbとNS3プロテアーゼのアフィニティーが弱くなったためであることが示唆される。

【0048】しかしながら、mAb 8D4は、NS3/4A融合蛋

白質のcisの切断を顕著に阻害するため、結果として、N S5A/5B切断配列における切断に必要であるNS4A断片の結合によるNS3プロテアーゼの活性上昇過程をもある程度抑える効果があると予測される。

【0049】（参考例3）HCVプロテアーゼの活性部位アミノ酸（His-57, Asp-81, Ser-139）を含むNS 3₁₋₁₆₀、具体的には、Cpro-2の酵素活性発現に不可欠な部分アミノ酸配列中に、当該mAb 7E3抗体、mAb 7E9抗体、mAb 8D4抗体に対するエピトープとなるアミノ酸配列を有していると推察される。

【0050】この三種の抗体のエピトープ配列を特定する目的で、連続した12個のアミノ酸がランダムな配列をとっている、市販のランダムペプチドライブラリー（商品名：FliTRX Random Peptide Display Library（Invitrogen））を利用して、それぞれの抗体と結合能を有するペプチド鎖のアミノ酸配列を選別した。該ランダムペプチドライブラリーは、12個のポリペプチドで構成されるランダムライブラリーを大腸菌由来のThioredoxin蛋白質の活性部位に挿入した改変蛋白質を、更に大腸菌べん毛を構成するFlagellin蛋白質中の非本質ドメイン（nonessential domain）内に挿入した融合蛋白質としてべん毛の上に提示させたものである（図13）。この融合蛋白質において、12個のポリペプチドで構成されるランダムペプチドライブラリーは、当該融合蛋白質自体を構成する他のドメインとは相互作用せず、別の蛋白質とのみ相互作用し、分子間結合を形成することが可能な形態を

取っている。特に、上記ランダムペプチドライブラリーは抗体との結合形成に適した形態をとっており、抗体のエピトープ決定に利用されるべく設計されたものである

（Z. Lu et al., Bio/Technology Vol. 13, 366-372 (1995) を参照）。一方、mAb 7E3、mAb 7E9、mAb 8D4は、常法に従いそれぞれのマウスハイブリドーマ細胞懸濁液をマウス腹腔に注入・腹水化し、Protein G-Sepharose（Pharmacia製）を用いたアフィニティー精製を行うことにより得られたものである（特開平9-206076号を参照）。なお、これらの抗体のタイプは三種類ともIgG1でL鎖はκ鎖であった。

【0051】各マウスモノクローナル抗体と結合するペプチドを発現する菌株の選別、およびそのペプチド鎖のアミノ酸配列の決定は、前記ランダムペプチドライブラリーのキットに添付される説明書及び文献（Z. Lu et al., Bio/Technology Vol. 13, 366-372 (1995)）を参照し、その標準的な手順に準じておこなった。実際に用いた手順の概要を次に説明する。

【0052】操作手順

1. 培養液の調製

以下の操作で用いる各種培養液等は、キット添付の説明書に従い、それぞれ下記の表3～5に示す組成に調製した。

【0053】10× M9 塩溶液（表3）

【0054】

【表3】

組成など	1 l 当たりの添加量
Na ₂ HPO ₄	60g
KH ₂ PO ₄	30g
NaCl	5g
NH ₄ Cl	10g
脱イオン水	900 ml
pH 7.4	1M NaOH 適量添加により調整

【0055】IMC 培地（表4）

【表4】

【0056】

組成など	1 l 当たりの添加量
1× M9 塩	10× M9 塩 100 ml
0.2% カザミノ酸	カザミノ酸 2 g
0.5% グルコース	50% グルコース 10 ml
1 mM MgCl ₂	1M MgCl ₂ 1 ml
100 μg/ml アンピシリン	100mg/ml アンピシリン 1 ml (オートクレーブ滅菌処理後に添加)
水	885 ml (調整時にオートクレーブ滅菌処理)

【0057】RM培地（表5）

【表5】

【0058】

組成など	1 l 当たりの添加量
1× M9 塩	10× M9 塩 100 ml
2% カザミノ酸	カザミノ酸 20 g
1% グリセロール	50% グリセロール 20 ml
1 mM MgCl ₂	1M MgCl ₂ 1 ml
100 μg/ml アンピシリン	100 mg/ml アンピシリン 1 ml (オートクレーブ滅菌処理後に添加)
水	880 ml (調整時にオートクレーブ滅菌処理)

【0059】2. FliTrxライブラリー（種菌）の培養
キット添付のライブラリー（種菌）をIMC 培地 50 mlに
植え継ぎ、25℃で攪拌しつつ終夜（約15時間）培養し
た。培養液から極少量のサンプルを採取し、その600 nm
での吸光度OD₆₀₀を測定し、その値から、1 OD₆₀₀=約1
×10⁹ 個(cells)の換算をし、大腸菌数を推定した。1×
10¹⁰個の大腸菌を含む培養液（通常2〜3 ml）を採り、1
00 μg/mlのトリプトファンを含むIMC 培地 50 mlに希釈
後、攪拌しつつ25℃で6時間培養し、この大腸菌の鞭毛
にペプチドライブラリーを発現させた。

【0060】3. 抗体に結合するクローンの選別（パニ
ング操作）

パニングは、下記の二種類の手法を用いた。

（1）プレートを用いたパニング

直径60 mmのプレート(Falcon 3002)に、20 μgの抗体を
含む水溶液（1 ml）を加え、室温に一時間置いて、抗体
をプレート表面に吸着させた。抗体を含む水溶液を取り
除き、5 mlの滅菌水ですすいだのち、7 mlのブロッキング
溶液（IMC 培地、1%脱脂粉乳、150 mM NaCl、0.4% α
-メチルマンノシド、100 μg/mlアンピシリン）を加えて
静かに攪拌後、室温に一時間置いた。

【0061】次に、上に述べたトリプトファンを含む培
養液で6時間培養した大腸菌培養液（50 ml）に、0.5 g
脱脂粉乳、1.5 mlの5 M NaCl、2.5 mlの滅菌 20% α-メチ
ルマンノシドを加えたのち、この液7 mlを抗体が固相化
されたプレートに加えた。静かに攪拌し、室温に一時間
静置後、大腸菌培養液を捨てた。プレート表面に吸着し
ている抗体に結合していない大腸菌を取り除くために、
プレートを7 mlの洗浄溶液（IMC培地、0.4% α-メチル
マンノシド）で3回洗った。最後に洗浄溶液を除いた後
（微量の溶液を残した状態で）、プレートに残っている
大腸菌を回収するため、抗体に結合した鞭毛を引きちぎ
る目的で、激しくボルテックス（超音波洗浄）をかけ
た。その後、10 mlのIMC 培地を加えて、剥離した大腸
菌を回収し、フラスコに移し、25℃で終夜培養した。

【0062】得られた第一次選別を施した大腸菌の培養
液について、再び1×10¹⁰個の大腸菌を含む培養液（通
常2〜3 ml）を採り、100 μg/mlのトリプトファンを含む
IMC 培地 50 mlに希釈後、攪拌しつつ25℃で6時間培養
し、この大腸菌の鞭毛にペプチドライブラリーを発現さ
せた。上で述べた一連の操作（パニング）を施し第二次
選別を行った。更に、3回同様の操作を施し、計5回の
選別を繰り返した後、抗体との結合能の高い第五次選別
を経た大腸菌複数を得た。なお、各菌株クローンの分離
は、下に述べる「4. ポジティブクローンの分離」に記
載の手法を用いた。

【0063】（2）マグネティックビーズ（マグネティ
ックセルソーター）を用いたパニング

上述のトリプトファンを含む培養液で6時間培養した大
腸菌8 mlをマイクロチューブに取り、遠心（4,000 rpm、

3分）して大腸菌を回収後、0.8 mlの洗浄バッファー（IMC
培地、150 mM NaCl、0.2 mg/ml BSA、0.4% α-メチルマ
ンノシド）で2度洗い、最後に0.5 mlの洗浄バッファー
で懸濁した。マウスモノクローナル抗体20 μgを加え
て、静かにピペットで攪拌後、30分間室温に静置した。
遠心して大腸菌を回収、洗浄バッファー（0.8 ml）中へ
の懸濁を2回繰り返して、余分の抗体を取り除いた。そ
の後、回収した大腸菌を160 mlの洗浄バッファーに懸濁
した。

【0064】次いで、回収した大腸菌から、目的の抗体
と結合している大腸菌を磁気細胞分離法（S. Miltenyi
et al., Cytometry 11, 231-238 (1990)を参照）を適
用して分離した。なお、磁気細胞分離システムは、Milt
enyi Biotec GmbH (BergischGladbach, Germany)製のも
のを使用した。前記の大腸菌懸濁液にヤギ抗マウス免疫
グロブリン（goat-anti-mouse immunoglobulin）G(H +
L) F(ab')₂が共有結合したマグネティックビーズ（Indir
ect Microbeads Goat-anti-mouse-IgG, Miltenyi Biote
c, Germany）40 mlを加えて静かに攪拌した。冷蔵庫中
（約8℃）で15分間静置後、遠心して大腸菌を回収し、余
分のビーズを取り除き、0.5 mlの洗浄バッファーに懸濁
した。この大腸菌懸濁液を、強磁場中にセットされ、3
mlの洗浄バッファーで平衡化した分離カラム（Separatio
n Column, type LS+）上にアプライし、3 mlの洗浄バッ
ファーで3回洗って、ビーズが結合していない大腸菌を
洗い流した。分離カラムを磁場中からはずした後、5 ml
のIMC 培地を加えて目的の大腸菌を滅菌済みのフラスコ
（100 ml）中に回収した。IMC 培地を5 ml加えて培養液を
10 mlとし、25℃で終夜培養した。

【0065】得られた第一次選別を施した大腸菌の培養
液について、再び1×10¹⁰個の大腸菌を含む培養液（通
常2〜3 ml）を採り、100 μg/mlのトリプトファンを含む
IMC培地 50 mlに希釈後、攪拌しつつ25℃で6時間培養
し、この大腸菌の鞭毛にペプチドライブラリーを発現さ
せた。上述した一連の操作（パニング）を施し第二次選
別を行った。なお、この2回目のパニング操作では、最
初の大腸菌量とターゲット抗体の量を半分にした。この
第二次選別の結果、抗体との結合能の高い大腸菌複数を
えた。なお、各菌株クローンの分離は、下に述べる

「4. ポジティブクローンの分離」に記載の手法を用い
た。

【0066】4. ポジティブクローンの分離

上記したパニングの終了した大腸菌を、1.5%寒天を含
むRM培地に広げて30℃で終夜（16〜24時間）培養後、シン
グルコロニーを拾い、2 mlのRM培地中に植えたのち、30
℃で16〜24時間、攪拌培養した。この大腸菌0.1 mlを、
100 μg/mlのトリプトファンを含む5 mlのIMC培地に希釈
後、37℃で8または16時間攪拌培養してペプチドライブ
ラリーを発現させた。終夜培養した残りの大腸菌は、最
終濃度が20%になるようにグリセロールを添加後、-70℃

で保存した。

【0067】5. ウェスタンブロッティングによるポジティブクローンの確認

この分離で得られたクローンについて、上記のペプチドライブラリー発現を行ったのち、実際に目的とする抗体と結合するペプチド鎖を有するものであることを確認した。即ち、大腸菌の鞭毛を構成する蛋白質（フラジェリン）に融合されているチオレドキシシン中に当該ペプチドライブラリーは挿入されているはずである。そこで、チオレドキシシン自体に対するマウス抗体と目的とする抗体の双方を用いて、ウェスタンブロッティング法により、目的とする抗体と結合するペプチド鎖が挿入されたフラジェリン蛋白質の確認を行った。

【0068】上のペプチドライブラリー発現を行った大腸菌の培養液4 mlを回収して、すぐに50 mlのSDS-サンプルバッファー（0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% グリセロール, 0.4% SDS, 0.01% プロモフェノールブルー）を加えて懸濁した。超音波をかけて高分子DNAを破壊して溶液の粘度を下げ、95℃で3分間インキュベートした。遠心(15,000 rpm, 10分)して不溶物を取り除き、SDS-PAGE用のサンプルとした。12.5%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、市販のPVDF膜（Trans-Blot Transfer Medium 0.2 mm, Bio-Rad Laboratories）にブロッティングした。上記の処理を施したことにより、抗原ペプチドと目的の抗体との結合が弱くなる、あるいは、該抗原ペプチドが挿入されているチオレドキシシン蛋白質とチオレドキシシン自体に対する抗体との結合が弱くなることも考えられ、これら一次抗体との結合は、4℃で一晩行った。

【0069】ウェスタンブロッティングにおけるバンド検出には、市販の試薬を用い、標識酵素法を適用した。二次抗体は、ビオチン化ヤギ抗マウス IgG (Life Tech.)を用い、このビオチン化二次抗体に、標識酵素としてストレプトアビジン-パーオキシダーゼコンジュゲート (Tago, Inc.)を結合させたのち、DAB Peroxidase Substrate Tablet Set (Sigma)を発色基質として、バンドを検出した。チオレドキシシン自体に対するマウス抗体と目的とする抗体の双方と強い結合が確認されたポジティブクローンにおいては、このペプチドライブラリーにおいて挿入されている12アミノ酸残基のペプチド鎖部分に目的とする抗体と結合が可能なエピトープが存在することが確認された。

【0070】6. ポジティブクローンの抗原性ペプチド鎖のアミノ酸配列の同定

上記のウェスタンブロッティング法により確認を行ったポジティブクローンについて、挿入されている12アミノ酸残基のペプチド鎖部分並びにそれに近接する領域、即ち、図14に示す組換え遺伝子領域にコードされるアミノ酸配列を次の手順で同定した。用いたペプチドライブラリーの当該ペプチド鎖は、図13に示すとおり、プラ

スミドpFliTrx (Invitrogen) 中にその遺伝子が組み込まれたものである。

【0071】従って、各クローンからこのプラスミドpFliTrxをそれぞれ採取して、図14に示す既知の塩基配列中に挿入されているランダムペプチドコーディング領域の塩基配列を同定し、それがコードするアミノ酸配列として特定した。

【0072】上記のポジティブクローン確認が終了し、終夜培養した大腸菌は、グリセロール（終濃度が20%）を加えて、-70℃に保存した。その一部の大腸菌を用いて、RM寒天（RM培地, 1.5% Bacto Agar）プレート上に広げて、30℃で20～30時間培養して、シングルコロニーを分離した。30個のコロニーを拾ってプラスミドを調製した。あるいは、プラスミドの収率が非常に悪い場合には、25 mlのRM培地で培養した大腸菌を市販のキットQuiaagen tip-20を使ってプラスミドの調製を行うことで、DNAシーケンス可能なプラスミドを得ることができた。

【0073】DNAシーケンスは、[α -³²P]dCTPを用いるときは、Sequenase version 2 DNA Sequencing Kit (Amersham)を、自動DNAシーケンサー用には、AutoCycle DNA Sequencing Kit (Pharmacia)と5'末端にFITCラベルしたプライマーを使用した。両方法とも、用いたプライマーは、このランダムペプチドライブラリーのキットにおいて指定されている、FliTrx（5'-ATG TAC TCA AAG C GG ACG GGG CGA-3'）（配列番号9）とRSR（5'-TTG CCC TGA TAT TCG TCA GCG-3'）（配列番号10）の二種のプライマーである。

【0074】+鎖、-鎖ともDNAの塩基配列を決定し、その結果が一致することを確認した。前記の二種のプライマーは、図14に示す位置に対応する。この領域において既知である塩基配列とDNAシーケンスの結果得られた塩基配列とを対比されて、発現しているペプチド鎖のアミノ酸配列を導き出した。本実施例では、mAb 7E9抗体及びmAb 8D4抗体についてはプレートを用いたパニング法を適用し、mAb 7E3抗体についてはマグネティックピーズ（マグネティックセルソーター）を用いたパニング法を適用した。各抗体について、上記の手順で選別されたポジティブクローンについて、挿入されている12アミノ酸残基のペプチド鎖部分、及びそれに近接する領域のアミノ酸配列を同定した。

【0075】その結果の一例を図15～17（配列番号11～47）に示す。各抗体について、それと結合する12アミノ酸残基のペプチド鎖部分において相同性を有する部分に対応させたところ、図15～17において枠で囲む部分配列が高い相同性を有することが判った。これらmAb 7E9抗体、mAb 8D4抗体、mAb 7E3抗体は何れも、NS₃₁₋₁₆₀蛋白質を免疫抗原として作成され、且つCpro-2と結合するものであるので、図15～17に示す相同性の高い部分配列に対応するアミノ酸配列（配列番号11～47）がCpro-2のアミノ酸配列中に見出されるはずで

ある。この予測どおり、Cpro-2のアミノ酸配列中に、図15～17に対比して示すように、これらのポジティブクローンの相同性の高い部分配列に対応する配列が見出された。

【0076】即ち、mAb 7E3抗体に対してはGly⁸⁴-Trp⁸⁵-Pro⁸⁶が、mAb 7E9抗体に対してはArg¹¹⁷-Arg¹¹⁸-Arg¹¹⁹-Gly¹²⁰（配列番号48）が、mAb 8D4抗体に対してはAsp⁷⁹-Gln⁸⁰-Asp⁸¹-Leu⁸²-Val⁸³（配列番号49）が対応しており、これらの部分が各抗体のエピトープに含まれると結論された。なお、これらのエピトープとなる部分配列がCpro-2分子の如何なる位置に存在するかという点については、異なるC型肝炎ウイルス株であるHCV strain BK株のセリンプロテアーゼCpro-2分子のX線結晶構造解析結果（R. A. Love et al., Cell 87, 331-342 (1996)を参照）を参考にして、その三次元的な位置を図18に示した。

【0077】図18は、1文字表記されたアミノ酸により示された、触媒作用に参与する三つの残基（His⁵⁷, Asp⁸¹, Ser¹³⁹）を含め、当該蛋白質の活性部位を示したものである。2次構造を形成している部分、具体的にはβ鎖、αヘリックス、トリプシン様バレル構造中のβ鎖（A1-F1）については、リボン表示で示している。触媒中心の三つのアミノ酸残基（His⁵⁷, Asp⁸¹, Ser¹³⁹）はその側鎖構造で示されている。図18において、具体的には、mAb 8D4抗体とmAb 7E3抗体のエピトープ位置は、こ

のプロテアーゼの活性中心に位置するAsp⁸¹とその隣接する部分であるが、mAb 7E9抗体のエピトープ位置は、この活性中心ではなく、蛋白質表面に位置することが判る。

【0078】（実施例1）以上の参考例1～3の結果を踏まえ、mAb 8D4抗体の相補性決定領域（CDR）の何れかは、HCVセリンプロテアーゼの活性中心に位置するAsp⁸¹とその隣接する部分との結合に関与しており、当該CDRのアミノ酸配列に類似する直鎖状ペプチドもmAb 8D4抗体と同様に結合を形成すると推断した。また、その結合に伴い、HCVセリンプロテアーゼの活性を阻害する作用を示すと考えた。先ず、mAb 8D4抗体の変換領域のアミノ酸配列を解明する目的で、mAb 8D4抗体のFv遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列の解明と対応するアミノ酸配列の決定を行った。

【0079】(1) mAb 8D4のFv遺伝子のクローニング
mAb 8D4抗体を還元して構成する各鎖間のS-S結合を分断した後、SDS-PAGEによりH鎖とL鎖を分離し、PVDFメンブレン（Bio-Rad製）に転写し、CBB染色した。メンブレンを乾燥後、各々のバンドを切り取り、H鎖とL鎖のN末端アミノ酸配列分析を行った。表6に示すように、H鎖およびL鎖のN末端10残基のアミノ酸配列を決定し、それをもとにPCRプライマーを設計し、合成した。

【0080】

【表6】

H鎖およびL鎖のN末端10残基のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列

H鎖のN末端アミノ酸配列
NH₂-Asp-Ile-Val-Met-Thr-Gln-Ala-Ala-Pro-Ser（配列番号50）
5'-GAC ATT GTG ATG AC(A/C) CAG GCT GCA CCC TCC-3'（配列番号51）
L鎖のN末端アミノ酸配列
NH₂-(His-Ser)-Glu-Ile-Gln-Leu-Gln-Gln-Thr-Gly（配列番号52）
5'-GAG ATT CAG CTG CAG CAG ACT GGG-3'（配列番号53）

【0081】mAb 8D4抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、JE-8D4（FERM BP-5281）株を培養し、それよりPharmacia製Quickprep mRNA Purification Kitを用いてmRNAを調製した。このmRNAを用いて、市販のキット（宝酒造製RNA PCR Kit）と、以下に示すフォワードおよびリバースプライマーを用いて抗体遺伝子のFv領域のcDNAを増幅した。なお、フォワードプライマーは、上記の表6

に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列となっており、一方リバースプライマーは、マウスのIgG1抗体に共通するFv領域の下流部の塩基配列に相補的なものとなっている。

【0082】

【表7】

プライマーの塩基配列

フォワードプライマー（H鎖）
5'-GAG ATT CAG CTG CAG CAG ACT GGG-3'（配列番号53）
リバースプライマー（H鎖）
5'-GAA GTC CCG GGC CAG GCA GCC CAT GGC CAC-3'（配列番号54）
フォワードプライマー（L鎖）
5'-GAC ATT GTG ATG AC(A/C) CAG GCT GCA CCC TCC-3'（配列番号51）
リバースプライマー（L鎖）
5'-ACT GTT CAG GAC GCC ATT TTG TCG TTC ACT-3'（配列番号55）

【0083】PCR反応は、用いた市販のPCRキットにおいて推奨される手順、条件に準じて行なった。それぞれH鎖及びL鎖のFv領域cDNAからのPCR産物を得て、それぞれをTAクローニングベクター（pT7Blue, Novagen製）に

連結し、宿主大腸菌JM109株に導入した。形質転換体を、X-galを含むLB-アンピシリン寒天プレートにまき、白色コロニーを選別した。この白色コロニーを培養してプラスミドを調製し、H鎖およびL鎖遺伝子を有する組換

え菌をスクリーニングした。H鎖遺伝子を有するプラスミドpT7VH-CおよびL鎖遺伝子を有するプラスミドpT7VL-Cについて、各6クローンずつ選び、抗体遺伝子のFv領域cDNA塩基配列を決定した。マウスIgG1抗体に関しては、Fv領域cDNA上の相補性決定領域（CDR）の存在位置は一般に知られており、その知見に基づきH鎖およびL鎖について、それぞれ3箇所のCDRのアミノ酸配列を特定した。

【0084】なお、この過程で決定されたmAb 8D4抗体の変換領域であるFv領域をコードするcDNAの塩基配列及びその対応するアミノ酸配列を、H鎖に関して図2（配列番号7）に、L鎖に関して図3（配列番号8）にそれぞれ（H鎖遺伝子クローニング用）

8D4 VH FOR

5' - NNCGGCCCGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC - 3'（配列番号68）

Eag I

8D4 VH BACK

5' - NNNGGCCCGAGGCGCCATGGCCGAGATTCAGCTGCAGCAGAC - 3'（配列番号69）

Sfi I

（L鎖遺伝子クローニング用）

8D4 VH FOR

5' - NNCGCGCGTTATTTCCAGCTTGGTCCCCC - 3'（配列番号70）

Sac II

8D4 VH BACK

5' - NNNGATATCGTGATGACCCAGGCTGCA - 3'（配列番号71）

EcoRV

（NはA, G, C又はT）

【0087】得られたH鎖遺伝子を制限酵素Sfi IとEag Iで切断し、L鎖遺伝子を制限酵素EcoRVとSac IIで切断した後、アミノ酸配列[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]で3回繰り返したペプチドリンカーをコードする合成DNAを介して連結し、mAb 8D4一本鎖Fv遺伝子を構築した。

【0088】②mAb 8D4一本鎖Fv発現ベクターの構築
市販のファージT7プロモーターを有する発現ベクターpET-20b（+）（Novagen社）を制限酵素Xba Iで切断した後、Klenow処理により平滑末端化した。さらに、制限酵素EcoRIで切断し、ベクター断片を調製した。上記、mAb 8D4一本鎖Fv遺伝子上流に、ペクテトリアーゼ（pe1B）のシグナル配列遺伝子を連結した。一方、下流には、c-mycタグおよび6残基のHisタグをコードするDNA断片を連結した。この融合遺伝子断片とpET-20b（+）ベクターとを連結し、pET-20b（+）に融合遺伝子断片を導入することにより、図22に示す発現ベクターpET-8D4を構築した。なお、形質転換大腸菌株E. coli JM109/pET-8D4は、工業技術院生命工学工業技術

研究所（生命研）に、前記識別のための表示と寄託機関の付与した受託番号（FERM P-16444）の基に受託されている。

【0085】① mAb 8D4一本鎖Fv遺伝子の構築
RT-PCRによりクローニングしたmAb 8D4 Fv遺伝子を有するプラスミドpT7VH-C（H鎖遺伝子）およびpT7VL-C（L鎖遺伝子）を鋳型として、以下に示すDNAプライマーを用いてPCRによりH鎖およびL鎖遺伝子を増幅した。

【0086】

研究所（生命研）に、前記識別のための表示と寄託機関の付与した受託番号（FERM P-16444）の基に受託されている。

【0089】② mAb 8D4のCDRペプチドによるHCVプロテアーゼ阻害活性評価
mAb 8D4抗体のFv遺伝子の塩基配列解析よりCDRのアミノ酸配列を決定し、合計6種類のCDRを含むペプチドを合成した。合成したペプチドのアミノ酸配列を表8に示し、CDRに相当する部分に下線を付した。各ペプチドを終濃度20 mMとなるようにDMSOに溶かした後、DMSOで段階希釈した。これらのCDRペプチドを組換え基質（MBP-N S5A/5B-ADK）を用いたHCVプロテアーゼのアッセイ系に50分の1量（終濃度2% DMSO）添加し、酵素阻害活性を評価した。酵素アッセイ系の詳細は、文献に記載の方法に準じた（特開平9-9961号公報を参照）。

【0090】

【表8】

合成したペプチドのアミノ酸配列

CDR-H1 (15 mer) :
 NH₂-Gly-Tyr-Ser-Phe-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-Val-Lys-Gln-Ser-COOH (配列番号56)
 CDR-H2 (17 mer) :
 NH₂-Asn-Ser-Asn-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Thr-Ser-Tyr-Asn-Leu-Lys-Phe-Lys-Gly-COOH (配列番号57)
 CDR-H3 (15 mer) :
 NH₂-Cys-Ala-Arg-Gly-Gly-Phe-Tyr-Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-COOH (配列番号58)
 CDR-H1-7 (7 mer) :
 NH₂-Thr-Asp-Tyr-Val-Leu-Ile-Trp-COOH (配列番号59)
 CDR-L1 (16 mer) :
 NH₂-Arg-Ser-Ser-Lys-Ser-Leu-Leu-His-Ser-Asp-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-Tyr-COOH (配列番号60)
 CDR-L2 (15 mer) :
 NH₂-Leu-Leu-Ile-Tyr-Arg-Met-Ser-Asn-Leu-Ala-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-COOH (配列番号61)
 CDR-L3 (14 mer) :
 NH₂-Tyr-Tyr-Cys-Met-Gln-His-Leu-Glu-Tyr-Pro-Tyr-Thr-Phe-Gly-COOH (配列番号62)

【0091】その結果、図19に示すように15アミノ酸のCDR-H1が容量依存的な強い阻害活性を示し、IC₅₀ = 20.8 μMという値を示した。また、17アミノ酸のCDR-H2はIC₅₀ = 229 μMであり、CDR-H1と比較すると弱いながらも用量依存的な阻害を示した。さらに、CDR-H1より、はるかに短いペプチド長としても、例えば、そのCDRの5アミノ酸に両端各1アミノ酸が残るように7アミノ酸まで低分子化したCDR-H1-7でさえも、図20に示すとおり、IC₅₀ = 165 μMという容量依存的な阻害活性が確認された。但し、CDRの5アミノ酸のみとしたCDR-H1-5では、最早有意な阻害活性は見られなかった。

【0092】加えて、前記のCDR-H1-7の配列中、CDRの第1番目のアミノ酸（CDR-H1-7の配列の第2番目）であるAspを、Gluに置き換えたペプチドCDR-H1-7(D2E)（配列番号63）、Alaに置き換えたペプチドCDR-H1-7(D2A)（配列番号64）、及びArgに置き換えたペプチドCDR-H1-7(D2R)（配列番号65）においても、図21に示すとおり、添加濃度0.4 mMにおいてCDR-H1-7と同様に阻害活性を示した。また、前記CDR-H1-7の配列中、CDRの第2番目のアミノ酸（CDR-H1-7の配列の第3番目）であるTyrをTrpに置き換えたペプチドCDR-H1-7(Y3W)（配列番号66）、及びPheに置き換えたペプチドCDR-H1-7(Y3F)（配列番号67）においても、図21に示すとおり、添加濃度0.4 mMにおいてCDR-H1-7と同様に阻害活性を示した。特に、CDRの第1番目のアミノ酸AspをAlaに置き換えたもの（CDR-H1-7(D2A)（配列番号64））、及びCDRの第2番目のアミノ酸TyrをTrpに置き換えたもの（CDR-H1-7(Y3W)（配列番号66））は、比較の対照としたCDR-H1-7より優れた阻害活性を示した。

【0093】従って、上述の置き換えを施し、全体のペプチド長を7アミノ酸以上としたもの、例えば、CDR-H1のCDR相当部分を上述の置き換えを施したものにおいても、対応する阻害活性の向上が果たされると判断できる。即ち、CDR相当部分を保持し、その両端に本来の抗体で存在しているアミノ酸配列を延長したペプチドにおいては、CDR相当部分の結合能に加え、ペプチド鎖全体

の二次的な構造による結合能の向上効果が相まって、CDR-H1の阻害活性を超える阻害活性を示すものと考えられる。

【0094】

【発明の効果】本発明により、C型肝炎ウイルス由来のセリンプロテアーゼに対する中和抗体部分ペプチドが提供される。本発明の中和抗体部分ペプチドは、HCVセリンプロテアーゼの活性中心に存在するAsp⁸¹を含むエピソード配列Asp⁷⁹-Gln⁸⁰-Asp⁸¹-Leu⁸²-Val⁸³に選択的に結合するモノクローナル抗体の相補性決定領域（CDR）のアミノ酸配列、又はそれと類似するアミノ酸配列を有するので、HCVセリンプロテアーゼの活性中心又はその近傍に選択的且つ強固な結合をする。従って、この結合に伴い、HCVセリンプロテアーゼの活性を阻害する能力に優れ、加えて、20アミノ酸以下のペプチド鎖しかないので、化学的合成により容易に合成ができる利点を持つ。更に、本発明のペプチド鎖長は短いので、HCVセリンプロテアーゼの活性中心又はその近傍に結合するに際し、HCVセリンプロテアーゼと結合したNS4Aペプチド断片が存在する場合にも、プロテアーゼの基質ペプチドと同様に結合部位に容易に到達することが可能である。

【0095】

【配列表】

配列番号：1
 配列の長さ：5
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列の特徴
 存在位置：2
 他の情報：Xaa = Tyr, Trp or Phe

配列

Asp Xaa Val Leu Ile

【0096】配列番号：2
 配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列の特徴
 存在位置：1
 他の情報：Xaa = Asp, Ala, Glu or Arg

配列の長さ：17
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド

配列

Xaa Tyr Val Leu Ile

【0097】配列番号：3 5

配列

Asn Ser Asn Pro Tyr Tyr Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

【0098】配列番号：4

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to Genomic RNA

起源

生物名：C型肝炎ウイルス

株名：HCV-J

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：1..1893

配列

Asp Tyr Val Leu Ile

【0099】配列番号：5 5

配列の長さ：1893

配列の型：核酸

配列

GCG CCT ATC ACG GCC TAT TCC CAA CAA ACG CGG GGC CTG CTT GGC TGT 48

Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys

1 5 10 15

ATC ATC ACT AGC CTC ACA GGT CGG GAC AAG AAC CAG GTC GAT GGG GAG 96

Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly Glu

20 25 30

GTT CAG GTG CTC TCC ACC GCA ACG CAA TCT TTC CTG GCG ACC TGC GTC 144

Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val

35 40 45

AAT GGC GTG TGT TGG ACC GTC TAC CAT GGT GCC GGC TCG AAG ACC CTG 192

Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu

50 55 60

GCC GGC CCG AAG GGT CCA ATC ACC CAA ATG TAC ACC AAT GTA GAC CAG 240

Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln

65 70 75 80

GAC CTC GTC GGC TGG CCG GCG CCC CCC GGG GCG CGC TCC ATG ACA CCG 288

Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro

85 90 95

TGC ACC TGC GGC AGC TCG GAC CTT TAC TTG GTC ACG AGG CAT GCC GAT 336

Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp

100 105 110

GTC ATT CCG GTG CCG CCG CGA GGC GAC AGC AGG GGG AGT CTA CTC TCC 384

Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser

115 120 125

CCT AGG CCC GTC TCC TAC CTG AAG GGC TCC TCG GGT GGA CCA CTG CTT	432
ro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu	
130 135 140	
TGC CCT TCG GGG CAC GTT GTA GGC ATC TTC CGG GCT GCT GTG TGC ACC	480
Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr	
145 150 155 160	
CGG GGG GTT GCG AAG GCG GTG GAC TTC ATA CCC GTT GAG TCT ATG GAA	528
Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu	
165 170 175	
ACT ACC ATG CGG TCT CCG GTC TTC ACA GAC AAC TCA TCC CCT CCG GCC	576
Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala	
180 185 190	
GTA CCG CAA ACA TTC CAA GTG GCA CAT TTA CAC GCT CCC ACT GGC AGC	624
Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser	
195 200 205	
GGC AAG AGC ACC AAA GTG CCG GCT GCA TAT GCA GCC CAA GGG TAC AAG	672
Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys	
210 215 220	
GTG CTC GTC CTA AAC CCG TCC GTT GCT GCC ACA TTG GGC TTT GGA GCG	720
Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala	
225 230 235 240	
TAT ATG TCC AAG GCA CAT GGC ATC GAG CCT AAC ATC AGA ACT GGG GTA	768
Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val	
245 250 255	
AGG ACC ATC ACC ACG GGC GGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAT GGC AAG	816
Arg Thr Ile Thr Thr Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys	
260 265 270	
TTC CTT GCC GAC GGT GGA TGC TCC GGG GGC GCC TAT GAC ATC ATA ATA	864
Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile	
275 280 285	
TGT GAC GAA TGC CAC TCA ACT GAC TGG ACA ACC ATC TTG GGC ATC GGC	912
Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Trp Thr Thr Ile Leu Gly Ile Gly	
290 295 300	
ACA GTC CTG GAT CAG GCA GAG ACG GCT GGA GCG CGG CTC GTC GTG CTC	960
Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu	
305 310 315 320	
GCC ACC GCC ACG CCT CCG GGA TCG ATC ACC GTG CCA CAC CCC AAC ATC	1008
Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Ile Thr Val Pro His Pro Asn Ile	
325 330 335	
GAG GAA GTG GCC CTG TCC AAC ACT GGG GAG ATT CCC TTC TAT GGC AAA	1056
Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys	
340 345 350	
GCC ATC CCC ATT GAG GCC ATC AAG GGG GGA AGG CAT CTC ATC TTC TGC	1104
Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys	
355 360 365	
CAT TCC AAG AAG AAG TGT GAC GAG CTC GCC GCA AAG CTG ACA GGC CTC	1152
His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Gly Leu	
370 375 380	
GGA CTC AAT GCT GTA GCG TAT TAC CGG GGT CTC GAT GTG TCC GTC ATA	1200
Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile	

385	390	395	400	
CCG ACT AGC GGA GAC GTC GTT GTC GTG GCA ACA GAC GCT CTA ATG ACG	1248			
Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr				
405	410	415		
GGC TTT ACC GGC GAC TTT GAC TCA GTG ATC GAC TGC AAC ACA TGT GTC	1296			
Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val				
420	425	430		
ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC TTG GAT CCC ACC TTC ACC ATT GAG ACG	1344			
Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr				
435	440	445		
ACA ACC GTG CCC CAA GAC GCG GTG TCG CGC TCG CAG CGG CGA GGT AGG	1392			
Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly Arg				
450	455	460		
ACT GGC AGG GGC AGG AGT GGC ATC TAC AGG TTT GTG ACT CCA GGA GAA	1440			
Thr Gly Arg Gly Arg Ser Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly Glu				
465	470	475	480	
CGG CCC TCA GGC ATG TTC GAC TCC TCG GTC CTG TGT GAG TGC TAT GAC	1488			
Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp				
485	490	495		
GCA GGC TGC GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC GCT GAG ACT ACA GTC AGG	1536			
Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg				
500	505	510		
TTG CGG GCT TAC CTG AAT ACA CCA GGG TTG CCC GTC TGC CAG GAC CAT	1584			
Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His				
515	520	525		
CTG GAG TTC TGG GAA AGC GTC TTC ACA GGC CTC ACC CAC ATA GAT GCC	1632			
Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala				
530	535	540		
CAC TTC CTG TCC CAA ACC AAG CAG GCA GGA GAC AAC TTC CCC TAC CTG	1680			
His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu				
545	550	555	560	
GTG GCA TAC CAA GCC ACG GTG TGC GCC AGG GCT CAG GCT CCA CCT CCA	1728			
Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro				
565	570	575		
TCG TGG GAT CAA ATG TGG AAG TGT CTC ATA CGG CTT AAA CCT ACG CTG	1776			
Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu				
580	585	590		
CAC GGG CCA ACA CCC CTG CTG TAT AGG CTA GGA GCC GTT CAA AAT GAG	1824			
His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu				
595	600	605		
ATC ACC CTC ACA CAT CCC ATA ACC AAA TTC GTC ATG GCA TGC ATG TCG	1872			
Ile Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Phe Val Met Ala Cys Met Ser				
610	615	620		
GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACT	1893			
Ala Asp Leu Glu Val Val Thr				
625	630			

【0100】配列番号：6

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gln Asp Leu Val

1

5

【0101】配列番号:7

配列の長さ:447

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表わす記号:CDS

存在位置:1..447

配列

GAG	ATT	CAG	CTG	CAG	CAG	ACT	GGG	CCT	
GAA	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT			48
Glu	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Thr	Gly	Pro	
Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala			
1				5					
10					15				
TCA	GTG	AAG	ATA	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	
GGT	TAT	TCA	TTC	ACT	GAC	TAC			96
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr			
			20						25
				30					
GTC	TTA	ATC	TGG	GTG	AAA	CAG	AGC	CAT	
GGA	GAG	AGC	CTT	GAG	TGG	ATT			144
Val	Leu	Ile	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	
Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile			
			35						40
				45					
GGA	AAT	AGT	AAT	CCT	TAC	TAT	GGT	AGA	
ACT	AGT	TAC	AAC	CTG	AAG	TTC			192
Gly	Asn	Ser	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Arg	
Thr	Ser	Tyr	Asn	Leu	Lys	Phe			
			50						55
				60					
AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTA	GAC	
AAA	TCT	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC			240
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	
Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr			
			65						70
				75					80
ATG	CAG	CTC	AAC	AGT	CTG	ACA	TCT	GAG	
GAC	TCT	GCA	GTC	TAT	TAT	TGT			288
Met	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	
Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85					
				90					95
GCA	AGG	GGG	GGT	TTC	TAT	GCT	ATG	GAC	
TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	TCA			336
Ala	Arg	Gly	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser			
			100						105
				110					
GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCC	AAA	ACG	ACA	
CCC	CCA	TCT	GTC	TAT	CCA	CTG			384

Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr
Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu		
		115					120	
			125					
GCC	CCT	GGA	TCT	GCT	GCC	CAA	ACT	AAC
TCC	ATG	GTG	GCC	ATG	GGC	TGC		432
Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn
Ser	Met	Val	Ala	Met	Gly	Cys		
	130					135		
		140						
CTG	GCC	CGG	GAC	TTC				
							447	
Leu	Ala	Arg	Asp	Phe				
145								

【0102】配列番号：8

配列の長さ：501

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：1..501

配列

GAC ATT GTG ATG ACC CAG GCT GCA CCC TCC GTA CCT GTC ACT CCT GGA	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly	
1 5 10 15	
GAG TCA GTA TCC ATC TCC TGC GGG TCT AGT AAG AGT CTC CTG CAT AGT	96
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Gly Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser	
20 25 30	
GAT GGC AAC ACT TAC TTG TAT TGG TTC CTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT	144
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
CCT CAG CTC CTG ATA TAT CGG ATG TCC AAC CTT GCC TCA GGA GTC CCA	192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCA GGA ACT GCT TTC ACA CTG AGA ATC	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile	
65 70 75 80	
AGT AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTG GGT GTT TAT TAC TGT ATG CAA CAT	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His	
85 90 95	
CTA GAA TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AGA	336
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg	
100 105 110	
CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAC	384
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Asp	
115 120 125	
GAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC TTG AAC AAC TTC	432
Glu Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe	
130 135 140	
TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT GAT GGC AGT GAA CGA	480
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg	
145 150 155 160	

CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
165

501

【0103】配列番号: 9

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

配列

ATGTACTCAA AGCGGACGGG GCGA

【0104】配列番号: 10

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

配列

TTGCCCTGAT ATTCGTCAGC G

【0105】配列番号: 11

配列の長さ: 18

配列の型: アミノ酸

配列

Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro

1

5

10

15

Pro Gly

【0106】配列番号: 12

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Gly Asn Leu Lys Ala Asp Gln Asp Leu Val Ala Gly

【0107】配列番号: 13

10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Ala Glu Met Gln Lys Ala Asp Arg Asp Leu Val Val

1

5

10

【0108】配列番号: 14

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Gln Asp Ala Ser Asp Leu Asp Leu Val Gln Arg Leu

【0109】配列番号: 15

10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

24

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

21

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Gly Ile Gly Asp Ala Asp Leu Val Arg Pro Val Val

【0110】配列番号: 16

10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Asp Ser Asp Leu Ile Lys Glu Gly Gly Ala Glu Thr

【0111】配列番号: 17

10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Glu Ala Trp Gly Gly Asp Leu Asp Leu Ile Gly Ser

【0112】配列番号: 18

10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Leu Thr Ile Ala Gly Pro Asp Val Asp Leu Met Ala

【0113】配列番号: 19

10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Asn Asn Val Asp Ser Asp Leu Leu Val Pro His Gly
【0114】配列番号：20 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Met Val Met Cys Glu Ser Gly Val Asp Leu Val Pro
【0115】配列番号：21 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser
1 5 10 15
【0118】配列番号：24
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Ser Gln Gly Gly Arg Thr Ser Pro Arg Arg Arg Glu
【0119】配列番号：25 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Thr Lys Met Gly Ile Gly Thr Arg Arg Gly Trp Ile
【0120】配列番号：26 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Gln Gly Arg Arg Gly Leu Val Thr Phe Trp Leu Arg
【0121】配列番号：27 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状

配列
Gln Asn Asp Leu Ile Glu Pro Gly Glu Pro Ser Cys
【0116】配列番号：22 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Asp Tyr Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asp Leu Gly Leu
【0117】配列番号：23 10
配列の長さ：15
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Glu Val Ala Arg Arg Gly Gly Phe Trp Leu Leu Arg
【0122】配列番号：28 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Thr Leu Glu Tyr Ser Ala
【0123】配列番号：29 10
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列
Val Arg Leu Pro Phe Val Met Trp Arg Arg Ala Ile
1 5 10
【0124】配列番号：30
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列

Lys Gly Gly Ser Pro Arg Glu Arg Met Gly Leu Thr

【0125】配列番号: 31 10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Leu Glu Asp Ala Arg Glu Arg Leu Glu Ser Ser Gly

【0126】配列番号: 32 10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala

【0127】配列番号: 33 10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Ala His Cys Gly Trp Glu Tyr Leu Gly

Trp Pro Ser Gly Leu Cys Leu

1

5

10

15

【0130】配列番号: 36

配列の長さ: 16

配列の型: アミノ酸

配列

Trp Cys Gly Pro Gly Trp Pro Leu Ile Leu Lys Asp Asp Met Lys Ala

1

5

10

15

【0131】配列番号: 37

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Pro Asp Arg Arg Pro Gly Trp Arg Thr Pro Pro Arg

【0132】配列番号: 38 10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Trp Cys Gly Pro Ala Trp Pro Ser Val Gly Ala Ser Cys Ser Ala Ser

1

5

10

15

【0134】配列番号: 40

配列の種類: ペプチド

配列

Leu Gly Tyr Ala Trp Ala Arg His Gly Ala Ala Thr

【0128】配列番号: 34 10

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Glu Ser Arg Gly Ser Glu Arg Gly Trp Arg Thr Gln

【0129】配列番号: 35 10

配列の長さ: 16

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の種類: ペプチド

配列

Val Pro Gly Trp Pro Gln Asp His Ser Arg Asp Asp

【0133】配列番号: 39 10

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Gly Trp Pro Tyr Trp His Tyr Pro Pro Met Thr Asp

1

5

10

15

【0135】配列番号：41

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Asn Gly Trp Pro Ser Asn Gln Trp Ile Gln Tyr His

1

5

10

15

【0136】配列番号：42

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Gly Trp Arg Thr Gly Ala Ala Arg His Leu Gly Ser

1

5

10

15

【0137】配列番号：43

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ile Arg Arg Thr Val Gly Arg Gly Trp Pro Val Asp Gly Leu Cys Leu

1

5

10

15

【0138】配列番号：44

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Gly Trp Ala Ser Gly Ser Thr Gln Met Leu Asp Ala

1

5

10

15

【0139】配列番号：45

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Gly Trp Pro Gln Val Gly Gln Thr Gly Ile Pro Phe

1

5

10

15

【0140】配列番号：46

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Met Ala Ser Leu Thr Pro Gly Trp Arg Ile Ala Gly Leu Cys Leu

1

5

10

15

【0141】配列番号：47

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Arg Arg Gly

配列

Thr Glu Ser Ala Ala Ser Gly Trp Pro Gly Val Thr

【0142】配列番号：48

10

【0143】配列番号：49

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gln Asp Leu Val

【0144】配列番号：50 5

配列の長さ：10
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列

GACATTGTGA TGACMCAGGC TGCACCCTCC

30

【0146】配列番号：52

配列の長さ：10
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列の長さ：24

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Thr Gly

【0147】配列番号：53 10

配列

GAGATTCAGC TGCAGCAGAC TGGG

24

【0148】配列番号：54

配列の長さ：30
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

GAAGTCCCGG GCCAGGCAGC CCATGGCCAC

30

【0149】配列番号：55

配列の長さ：30
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

ACTGTTTCAGG ACGCCATTTT GTCGTTCACT

30

【0150】配列番号：56

配列の長さ：15
配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Val Leu Ile Trp Val Lys Gln Ser

1 5 10 15

【0151】配列番号：57

配列の長さ：17
配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列

Asn Ser Asn Pro Tyr Tyr Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

【0152】配列番号：58

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Ala Met
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5
10 15

【0153】配列番号：59

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Asp Tyr Val Leu Ile Trp

配列

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

【0155】配列番号：61

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

配列

Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp
1 5 10 15

【0156】配列番号：62

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly
1 5 10

【0157】配列番号：63

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Glu Tyr Val Leu Ile Trp

【0158】配列番号：64 5

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Ala Tyr Val Leu Ile Trp

【0159】配列番号：65 5

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Arg Tyr Val Leu Ile Trp

【0160】配列番号：66 5

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Asp Trp Val Leu Ile Trp

【0161】配列番号：67 5

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Asp Phe Val Leu Ile Trp

【0162】配列番号：68 5

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状

配列

NNNCGGCCGA GGAGACGGTG ACTGAGGTTC C

31

【0163】配列番号：69

配列の長さ：32

配列の型：核酸

配列

NNNGGCCAG CCGCCATGG CCGAGATTCA GCTGCAGCAG AC

32

【0164】配列番号：70

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

NNNCCGCGGT TATTTCCAGC TTGGTCCCCC

30

【0165】配列番号：71

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

NNNGATATCG TGATGCCCA GGCTGCA

27

【図面の簡単な説明】

【図1】C型肝炎ウイルス遺伝子構造とそれにコードされる各種蛋白質を示す図。

【図2】mAb 8D4抗体のH鎖のFv領域をコードするcDNAの塩基配列及びその対応するアミノ酸配列を示す図。

【図3】mAb 8D4抗体のL鎖のFv領域をコードするcDNAの塩基配列及びその対応するアミノ酸配列を示す図。

【図4】mAb 8D4抗体の添加濃度に対するHCVセリンプロテアーゼとの結合活性の指標kon値をプロットしたLinear Fitの結果を示す図。

【図5】mAb 7E9抗体の添加濃度に対するHCVセリンプロテアーゼとの結合活性の指標kon値をプロットしたLinear Fitの結果を示す図。

【図6】mAb 7E3抗体の添加濃度に対するHCVセリンプロテアーゼとの結合活性の指標kon値をプロットしたLinear Fitの結果を示す図。

【図7】mAb 8D4抗体、mAb 7E9抗体、mAb 7E3抗体の組換え型HCVセリンプロテアーゼMBP-p70に対する酵素活性阻害能を示す図。

【図8】ウサギ網状赤血球溶血液を用いたHCVゲノムの試験管内転写・翻訳系を利用したHCVプロテアーゼ酵素アッセイ系の概要を示す図。

【図9】ウサギ網状赤血球溶血液を用いたHCVゲノムの試験管内転写・翻訳系で発現したNS3/4A融合蛋白質のcisの切断に対するmAb 8D4抗体、mAb 7E9抗体、mAb 7E3抗体の阻害活性を比較する電気泳動写真。

【図10】NS3/4A融合蛋白質のcisの切断に対するmAb 8D4抗体の阻害活性における濃度依存性を示す電気泳動写真。

【図11】ウサギ網状赤血球溶血液を用いたHCVゲノムの試験管内転写・翻訳系でNS5A/5Bを翻訳させる際、NS3

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

プロテアーゼ又はNS3/4Aプロテアーゼによるtransの切断の有無を切断産物である分子量66 kDaのNS5B蛋白質量の比較により検証する電気泳動写真。

【図12】NS5A/5Bを翻訳させる際、NS3/4Aプロテアーゼのtransの切断に対するmAb 8D4抗体、mAb 7E9抗体、mAb 7E3抗体の阻害活性の有無を検証する電気泳動写真。

【図13】ランダムペプチドライブラリーのプラスミドpFliTrxの概要を示す図。

【図14】プラスミドpFliTrx中のランダムペプチドコーディング領域の塩基配列の上流及び下流に存在する既知の塩基配列を示す図。

【図15】mAb 8D4抗体と結合能を持つペプチドのアミノ酸配列と推定されるエピトープ配列との対応を示す図。

【図16】mAb 7E9抗体と結合能を持つペプチドのアミノ酸配列と推定されるエピトープ配列との対応を示す図。

【図17】mAb 7E3抗体と結合能を持つペプチドのアミノ酸配列と推定されるエピトープ配列との対応を示す図。

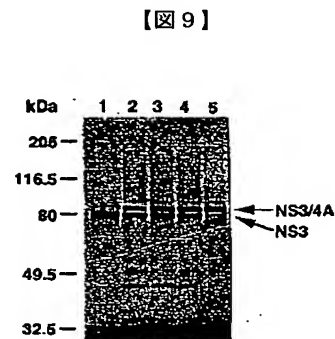
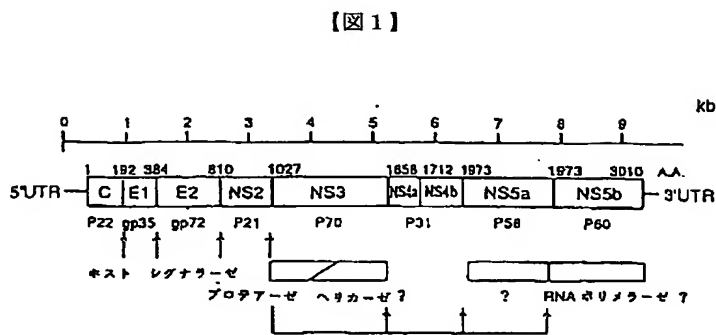
【図18】mAb 8D4抗体、mAb 7E9抗体、mAb 7E3抗体のエピトープの存在位置をHCVセリンプロテアーゼの分子上に示す図。

【図19】mAb 8D4抗体由来のCDRペプチドによるHCVプロテアーゼ阻害活性の有無を示す図。

【図20】mAb 8D4抗体H鎖のCDR1を内部に持つCDRペプチドによるHCVプロテアーゼ阻害活性に対するペプチド鎖長による差違を示す図。

【図21】mAb 8D4抗体由来の種々CDRペプチドにおけるHCVプロテアーゼ阻害活性とアミノ酸置換の効果を示す図。

保持されているプラスミド pET-8D4 の概略図。



【 図 2 】

```

      10          20          30          40          50          60
GAGATTCAAGCTGCAGCAGACTGGGCTGAAGCTGGTGAAGCCCTGGGCTTCAGTGAAGATA
GluIleGlnLeuGlnGlnThrGlyProGluLeuValIysProGlyAlaSerValIysIle

      70          80          90          100         110         120
TCCTGCAAGGCTTCTGCTATTATTCATCTACTGACTACGTTCTTAATCTGGGTGAACAGAGGC
SerCysLysAlaSerGlyTyrSerPheThrAspTyrValLeuIleTrpValIysGlnSer
                                CDR-1

      130         140         150         160         170         180
CATGGAGAGACGCTTGAGTGGATTGGAATAGTAATCCTTACTATGGTAGAAGCTAGTTAC
HisGlyGluSerLeuGlnTrpIleGlyAsnSerAsnProTyrTyrGlyArgThrSerTyr
                                CDR-2

      190         200         210         220         230         240
AACCTGAAGTTCAAAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCTCCAGCACAGCCTAC
AsnLeuLysPheLysGlyGlyLysAlaThrLeuThrValAspLysSerSerSerThrAlaTyr

      250         260         270         280         290         300
ATGCAGCTCAACAGCTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGGGGGGT
MetGlnLeuAsnSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgGlyGly

      310         320         330         340         350         360
TTCATGCTATGCACTACTGGGCTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCCTACGCCAAACGG
PheTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerAlaLysThr
                                CH1----->
                                CDR-3

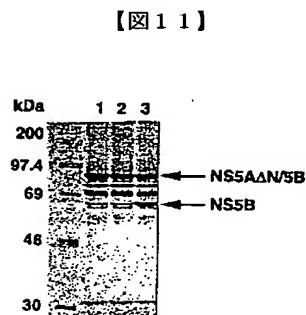
      370         380         390         400         410         420
ACACCCCATCTGTGCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTG
ThrProProSerValTyrProLeuAlaProGlySerAlaAlaGlnThrAsnSerMetVal

      430         440
GCCATGGGCTGCCTGGCCCGGGACTTC
AlaMetGlyCysLeuAlaArgAspPhe

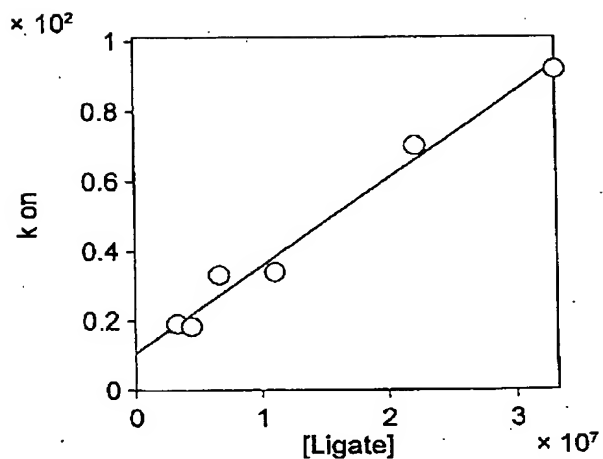
```

【 図 3 】

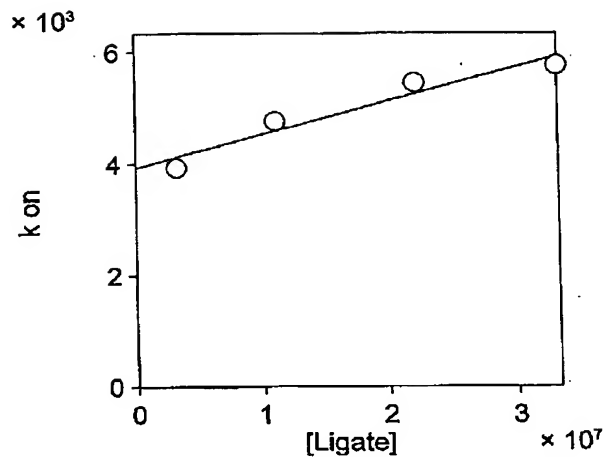
10	20	30	40	50	60
GACATTGTGATGACCCAGCGCTGCACCTCTCGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCC					
AspIleValMetThrGlnAlaAlaProSerValProValThrProGlyGluSerValSer					
70	80	90	100	110	120
ATCTCTCGCGGGTCTAGTAAGAGTCTCTCGCATAGTGATGGCAACACTTACTTGATTGG					
IleSerCysGlySerSerSerLysSerLeuLeuHisSerAspGlyAsnThrLeuTyrTrp					
CDR-1					
130	140	150	160	170	180
TTCCTACAGAGGCCAGGCCAGCTCTCTCACTGCTGATATATCGGATGTGCCAACCTTGCC					
PheLeuGlnArgProGlyGlnSerProGlnLeuLeuIleTyrArgValSerAsnLeuAla					
CDR-2					
190	200	210	220	230	240
TCAGGAGTCCCGACAGGTTCACTGCCAGTGGGTCAGGAACCTGCTTCCACTTGAGAAT					
SerGlyValProAspArgPheSerGlySerGlyThrAlaPheThrLeuArgIle					
250	260	270	280	290	300
AGTAGAGTGGAGGCTCAGGATGTCGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAAATATCCG					
SerArgValGluAlaGlnAspValGlyValTyrTyrCysMetGlnIleGluTyrPro					
CDR-3					
310	320	330	340	350	360
TACACGTTCCGAGGGGGGCAACGATGGAAATAAGACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA					
TyrThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleArgArgAlaAspAlaAlaProThrVal					
C kappa----->					
370	380	390	400	410	420
TCCATCTTCCCACCATCCAGTGACAGTTAAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTC					
SerIlePheProProSerSerAspGluLeuThrSerSerGlyGlyAlaSerValValCysPhe					
430	440	450	460	470	480
TTGAAACAATCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGA					
LeuAsnAsnPheTyrProLysAspIleAsnValLysTrpLysIleAspGlySerGluArg					
490	500				
CAAAATGGCGTCCTGAACAGT					
GlnAsnGlyValLeuAsnSer					



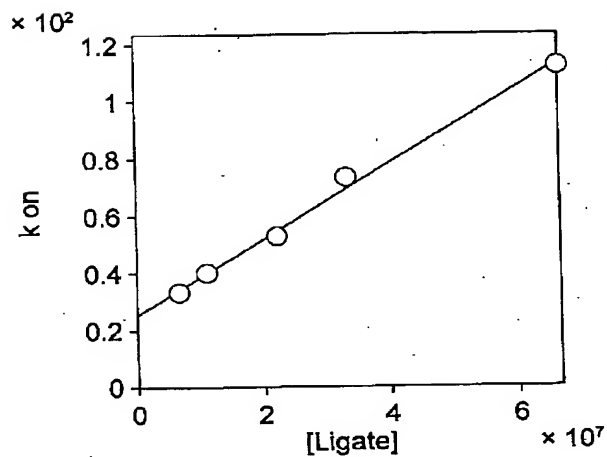
【図4】



【図5】

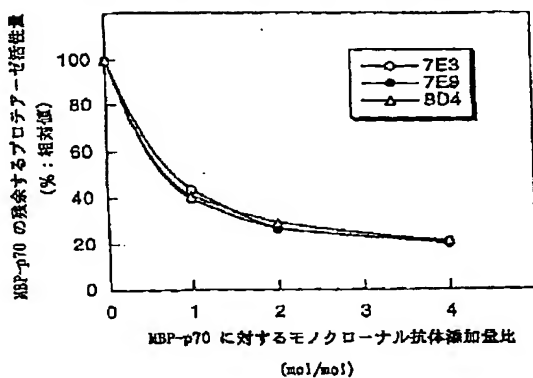


【図6】



【図7】

MBP-p70 に対するモノクローナル抗体によるプロテアーゼ活性阻害



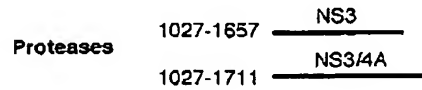
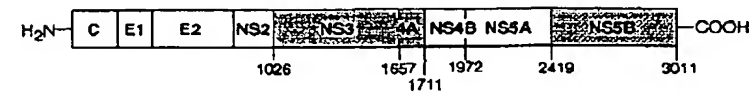
【図15】

mAB 8D4 のエピトープマッピング

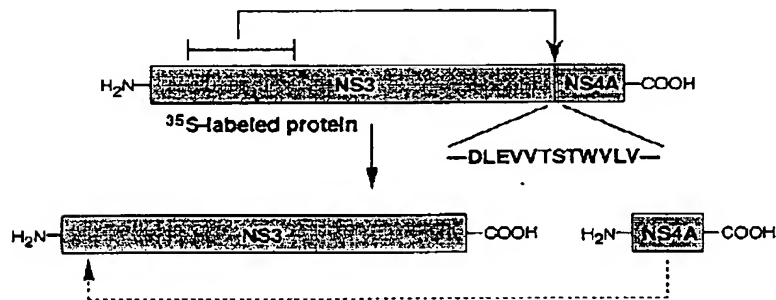
	80															90					配列番号
NS3	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	N	P	A	P	P	G	11		
#35		G	N	L	K	A	D	Q	D	L	V	A	G						12		
#121	A	E	M	Q	K	A	D	R	D	L	V	V							13		
#135		Q	D	A	S		D	L	D	L	V	Q	R	L					14		
#40			G	I	G		D	A	D	L	V	R	P	V	V				15		
#115							D	S	D	L	I	K	E	G	G	A	B	T	16		
#36		E	A	W	G	G	D	L	D	L	I	G	S						17		
#37	L	T	I	A	G	F	D	V	D	L	M	A							18		
#38			N	N	V		D	S	D	L	L	V	P	H	G				19		
#53	M	V	M	C	R	S	Q	V	D	L	V	P							20		
#55							Q	N	D	L	I	E	P	G	R	P	S	C	21		
#60	D	Y	E	G	S	S	A	A	D	L	G	L							22		

【図8】

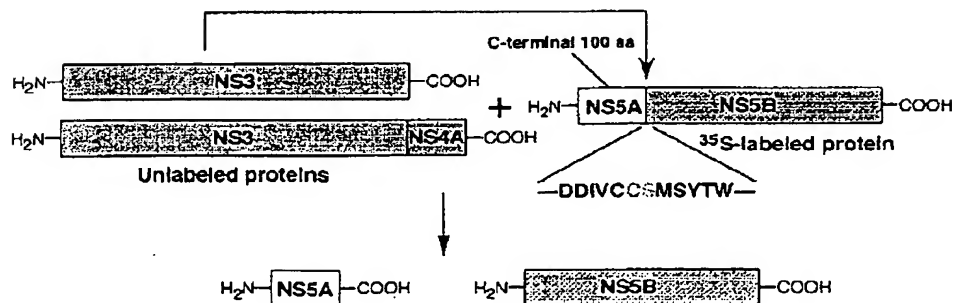
ウサギ網状赤血球溶血液を用いた転写・翻訳系
によるHCVプロテアーゼのアッセイ系



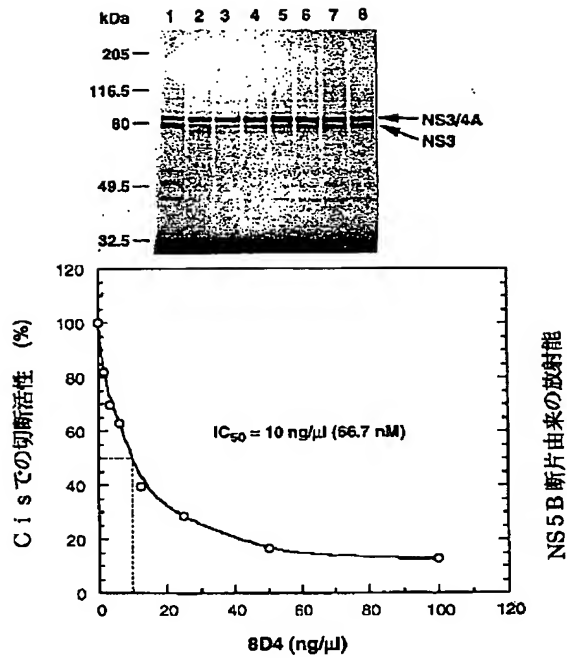
NS3プロテアーゼのシスでの切断システム



NS3プロテアーゼのトランスでの切断システム



【図10】



【図14】

ランダムペプチド周辺のDNA配列とプライマーの配置

Fl1Tx2 **Fl1Tx3**

AAAAACACCG GTGGTGATTA CGATGGTATG AGCGATAAAA TTATTCACCT
 TTTTACTGCC CACCACTATT GCTACCATAC TCGCTATTTT AATAAGTGA

Fl1Tx3

GACTGACGAC AGTTTGTACA CGCATGTA CTAAAGCGGAC GGGGCGATCC
 CTGACTGCTG TCAAAACTGT GCTACATGA GTTCGCGCTG CCGCGCTAGG

TCGTCGATTT CTGGGCAGAG TGGTGGGTC CG-----36bp-----GGTC
 AGCAGCTAAA GACCGTCTC ACCACGCCAG GC-----36bp-----CCAG

↑
ランダムペプチドコーディング領域

CGTGCAAAAT GATGGCCCCG ATTCTGGATG AAATCGCTGA CGAATATCAG
 GCACGTTTTA CTAGCGGGGC TAAGACCTAC TTTAGCGACT GCTTATAGTC

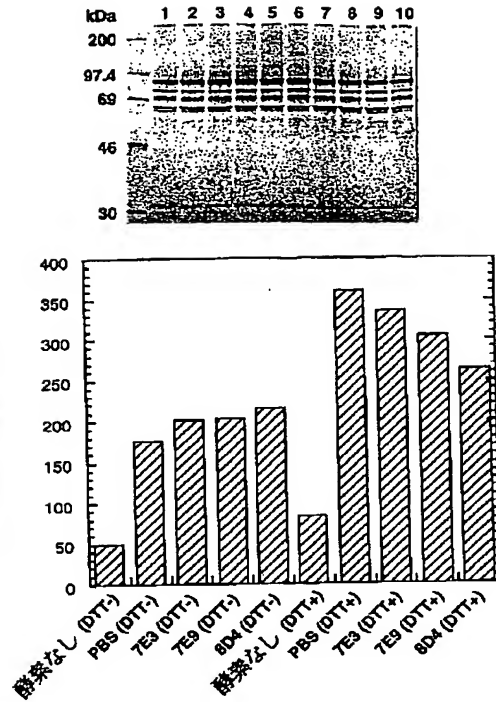
RSR1

GGCAAACTGA CCGTTGCAAA ACTGAACATC GATCAAAACC CTGGCACTGC
 CCGTTTGA CTGCAACGTTT TGACTTGTAG CTAGTTTGG GACCGTGAAG

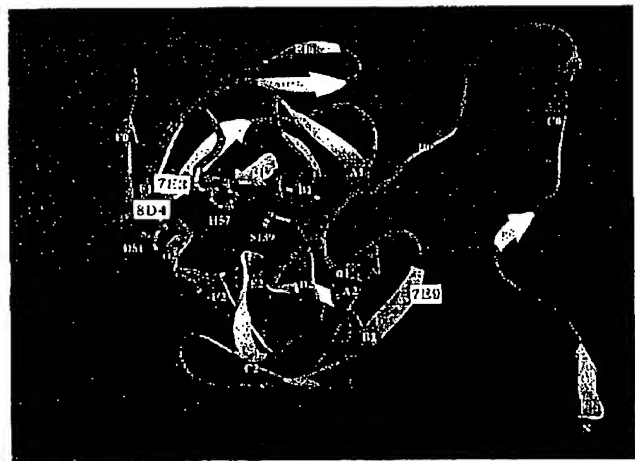
RSR2

GCCGAAATAT
 CCGCTTTATA

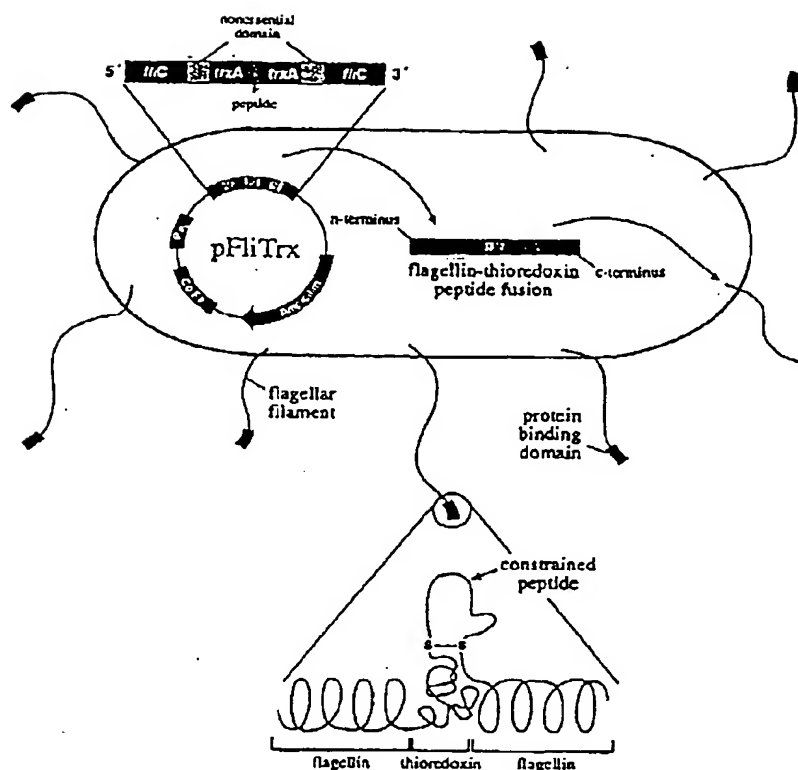
【図12】



【図18】



【図13】



【図16】

mAB 7E9のエピトープマッピング

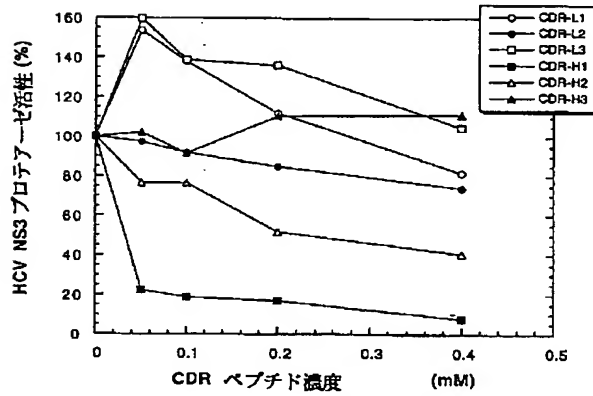
	111	120	配列番号
NS3	A D V I P V <u>R R R G</u> D S R G S		23
7E9/#183	S Q G G R T S P	R R R R	24
7E9/#237	T K M G I G	T R R G W I	25
7E9/#241		Q G R R G L V T F W L R	26
7E9/#427		E V A R R G G F W L L R	27
7E9/#429		P R R R L G T L E Y S A	28
7E9/#446	V R L P F V M	W R R A I	29
7E9/#444	K G G S P	R R R M G L T	30
7E9/#162	L E D A	R R R L E S S G	31

【図17】

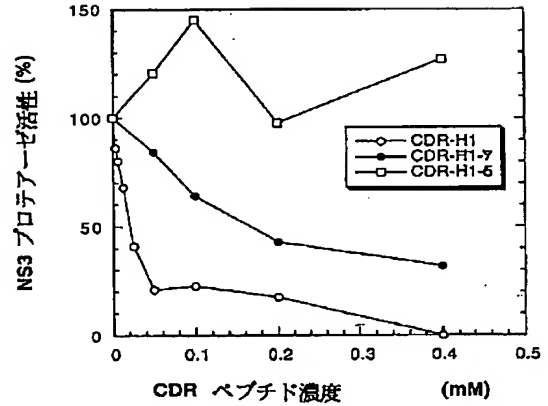
mAb 7E3 のエピトープマッピング

	80										90										配列番号
NS3	Q D L V Q W F A P P G A																				32
#1					L	G	Y	A	W	A	R	H	G	A	A	T					33
#4		E	S	R	G	S	B	R	G	W	R	T	Q								34
#6	A	H	C	G	W	E	Y	L	G	W	F	S	O	L	C	L					35
#10					W	C	G	P	G	W	F	L	I	L	K	D	D	H	K	A	36
#11				P	D	R	R	P	G	W	R	T	P	P	R						37
#12						V	P		G	W	F	Q	D	H	S	R	D	D			38
#13					W	C	G	P	A	W	F	S	V	G	A	S	C	S	A	S	39
#15					W	C	G	P	G	W	F	Y	W	H	Y	P	P	M	T	D	40
#16				W	C	G	P	N	G	W	F	S	H	Q	W	I	Q	Y	H		41
#17					W	C	G	P	G	W	R	T	G	A	A	R	H	L	G	S	42
#18		I	R	R	T	V	G	R	G	W	F	V	D	G	L	C	L				43
#19					W	C	G	P	G	W	A	S	O	S	T	Q	M	L	D	A	44
#21					W	C	G	P	G	W	F	Q	V	G	Q	T	G	I	P	F	45
#24		G	M	A	S	L	T	P	G	W	R	I	A	C	L	C	L				46
#26			T	E	S	A	A	S	G	W	F	G	V	T							47

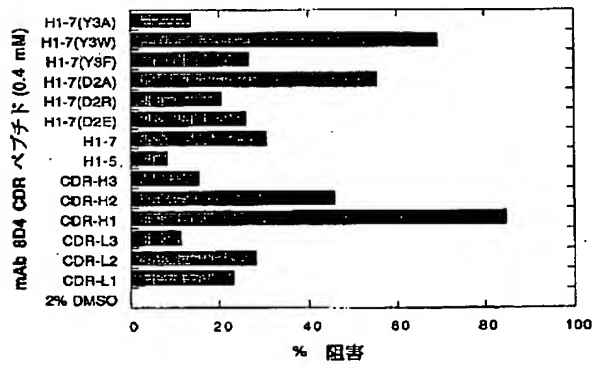
【図19】



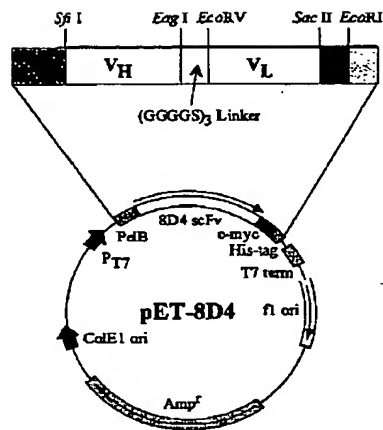
【図20】



【図21】



【図 2 2】



mAb 8D4—単鎖Fv発現ベクターpET-8D4の概略図

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 9/99		A 6 1 K 39/395	ACSD
// A 6 1 K 38/55	ADY	C 1 2 N 5/00	B
39/395	ACS	A 6 1 K 37/64	ADY
(C 1 2 N 15/09	ZNA		
C 1 2 R 1:92)			